

**ZIRKULARDICHROGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN KOMPLEXEN VON DEOXYRIBONUKLEINSÄUREN
MIT ANTIBIOTIKA**

von
Georg Fey
aus
Rietberg

1973

ZIRKULARDICHROGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KOMPLEXEN VON DEOXYRIBONUKLEINSÄUREN MIT ANTIBIOTIKA

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Georg Fey

aus

Rietberg

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1973

Dekan: Prof. Dr. W. Heumann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kersten
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. G. Huber

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.1	INHALTSVERZEICHNIS	
1.2	EINLEITUNG	1
1.2.1	Wahl des Themas - aus der Sicht des Autors	1
1.2.2	Problemstellung	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	Methoden	5
2.1.1	Prinzipien der Meßmethode: Zirkulardichroismus	6
2.1.2	Meßgrößen und Information	14
2.1.3	Meßtechnik	18
2.2	Material	24
2.2.1	DNA	24
2.2.2	Bakterien - Kulturbedingungen	25
2.2.3	DNA-Praeparation	25
2.2.4	Antibiotika., Sonstige Materialien	28
3.	RESULTATE	29
3.1	CD-Spektren von DNA allein	29
3.1.1	CD-Spektren von DNA verschiedener Spezies	29
3.1.2	CD-Spektren von Kalbsthymus DNA in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Metallionen	37
3.1.3	Heuristische Beschreibungsversuche	44
3.2	CD-Spektren von DNA-Komplexen mit Chromoglykosid-Antibiotika und zweiwertigen Metallionen	57

3.2.1	Bindungsstudien mit Chromomycin und Mithramycin im Sichtbaren und im nahen UV-Bereich (600-300 nm)	58
3.2.1.1	Absorptionsspektren und CD-Spektren	58
3.2.1.2	Einfluß von Mg^{2++} allein	61
3.2.1.3	Einfluß von DNA allein	62
3.2.1.4	Komplexe DNA- Mg^{2++} -Antibiotikum	65
3.2.1.5	Basenpraferenz der Chromomycin-Antibiotika	68
3.2.1.6	Interpretation der CD-Spektren	69
3.2.1.7	Temperaturabhängigkeit der Doublettbande	71
3.2.2.1	Modell des Mg-Chelat-Komplexes	74
3.2.2.2	Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptions- und CD-Spektren	75
3.2.2.3	Co^{2+} und Cu^{2+} -Ionen als Sonden	79
3.2.2.4	Protonenresonanz als Sonde	84
3.2.3	Bindungsstudien mit Nogalamycin und Daunomycin im Sichtbaren Spektralbereich und im nahen UV	88
3.2.3.1	Nogalamycin., Untersuchung der Basenpraferenz	88
3.2.3.2	Assoziation von Daunomycin an DNA	93
3.2.3	Bindung von Nogalamycin und Daunomycin an DNA., Messungen im fernen UV-Bereich	97
3.2.4.1	Nogalamycin	97
3.2.4.2	Daunomycin	102
3.2.5	Bindung von Chromomycin mit Mithramycin an DNA. Untersuchungen im fernen UV-Bereich	110
3.2.5.1	Chromomycin	110
3.2.5.2	Mithramycin	112
3.2.6	Zusammenfassende Beschreibung der Resultate der Bindungsstudien mit den vier Antibiotika im fernen UV-Bereich	115
3.2.6.1	Gesamtspektren der Komplexe	115
3.2.6.2	Differenzspektren der Komplexe	116
3.2.6.3	Matrix-Rang-Analysen	119
3.2.7	Diskussion der Ergebnisse mit den vier Antibiotika im fernen UV	122

3.2.7.1	Vorzeichenumkehr des Chromomycin-Doubletts bei 280 nm	126
3.3	Zirkulardichrographische Untersuchungen an Ethidium-Bromid-DNA-Komplexen	128
3.3.1	Problemstellung	128
3.3.2	Resultate	129
3.3.2.1	Bindungsisotherme mit verschiedenen DNA-Spezies	129
3.3.2.2	Induzierte CD-Banden; Abhängigkeit der Intensität vom Bindungsparameter r	130
3.3.2.3	Ab initio Berechnung der CD-Spektren von DNA bei variabler DNA Geometrie; Interkalationsgeometrien.	138
3.3.2.4	Diskussion der Berechnungen	148
3.3.2.5	Modifiziertes Interkalationsmodell für Proflavin	150
3.3.2.6	Zusammenfassung der Resultate mit Ethidium-Bromid	158
3.4	Zusammenfassung der wichtigsten Resultate der Arbeit	159

LITERATURVERZEICHNIS	161
----------------------	-----

4.	ANHANG	1
4.1	Anhang 1; Programme zum heuristischen Tinoco-Fit	2
4.2	Anhang 2; Programme zur Auswertung der Lochstreifen von der Datex-Ausgabe des Cary 60 Spektropolarimeters	8
4.2.1	Taperead-Programm	8
4.2.2	Cardprint-Programm	14
4.2.3	Averager-Programm	14
4.2.4	Deltae-Programm	14
4.3	Anhang 3; Beschreibung der Theorie von Johnson und Tinoco und der Programme zu ihrer Anwendung	21

4.3.1	Beschreibung der Theorie	32
4.3.2	Beschreibung der Programme	45
4.3.2.1	Gemeinsamkeiten der Programme zur Berechnung von A1 und B2	45
4.3.2.2	Besonderheiten des A1-Programms	66
4.3.2.3	Besonderheiten des B2-Programms	70
4.3.2.4	A1 und B2-Werte für variable Geometrien der DNA	73
4.3.2.5	Numerische Berechnung der CD-Spektren aus den A1 und B2-Werten	84

1.2 EINLEITUNG

1.2.1 Wahl des Themas - aus der Sicht des Autors

Die Transkription der genetischen Information vom DNA - Original in eine RNA-Kopie ist ein zentrales Problem der Molekularbiologie. Zum Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit wurde eine Gruppe von Antibiotika gewählt, die den Transkriptionsprozeß hemmen. Einige dieser Antibiotika haben tumorstatische Wirkung. So wird zum Beispiel das Antibiotikum Daunomycin gelegentlich neben einer Bestrahlung in einer kombinierten Tumorbehandlung eingesetzt. Das Studium des Wirkungsmechanismus von Antibiotika wurde zum Thema gewählt, um dem Wunsch des Autors nach einer Forschungstätigkeit mit einer Komponente klinischer Relevanz zu entsprechen. Durch die Wahl vorwiegend physikalisch-chemischer Untersuchungsmethoden sollte die vorherige Ausbildung des Autors zum Physiker optimal ausgenutzt werden. Dies geschah auch aus der Einsicht heraus, daß mit zunehmendem Fortschritt in der Biochemie diesen Methoden immer größere Bedeutung zukommen wird, selbst wenn ihr Einsatz derzeit noch oft mühsam und undankbar erscheint. Insgesamt wurde versucht, die Arbeit nicht methoden- sondern problemorientiert zu gestalten.

1.2.2 Problemstellung - im Rahmen der Arbeitsgruppe

Die Chromoglykosidantibiotika, zu denen die hier untersuchten Hemmstoffgruppen mit Daunomycin und Nogalamycin einerseits und mit Chromomycin A3 und Mithramycin andererseits gehören, entfalten ihre Wirkung durch Bindung an die DNA-Matrize. (KERSTEN, W., KERSTEN, H. und SZYBALSKI, W. 1966). Im Anschluß an frühere Arbeiten (HARTMANN, G.

et al. 1964; KOSCHEL, K. et al. 1966; KERSTEN, W. et al. 1967; KERSTEN, W. und KERSTEN, H. 1967; KERSTEN, W. und KERSTEN, H. 1968; ERFMANN, H. 1969;) stellte sich in der Arbeitsgruppe das Problem, herauszufinden wie der Block auf die Matrizenfunktion der DNA zustande kommt. Welche Aussagen lassen sich über physikalische Details der Wechselwirkung zwischen DNA und Hemmstoffmolekül aufstellen?

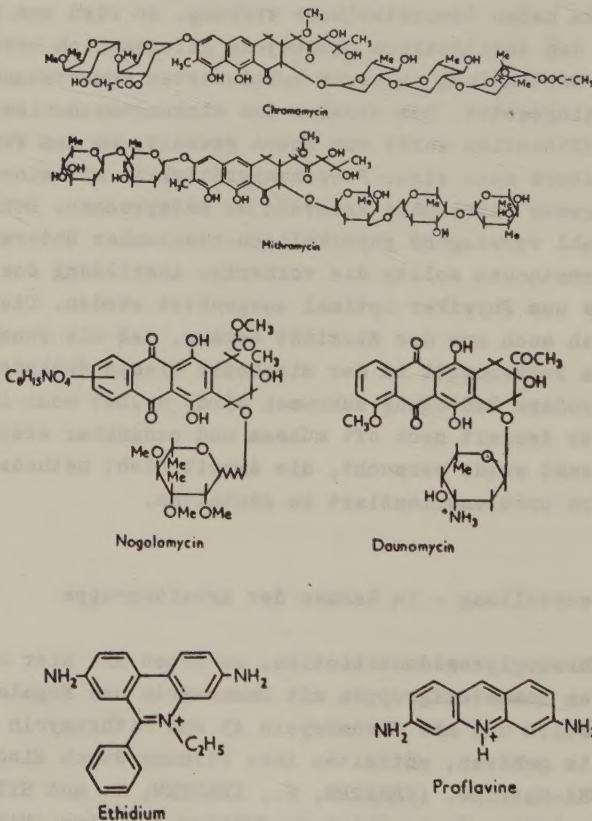


Abb. 1

Über den Wirkungsmechanismus der Chromoglykosid-Antibiotika waren zu Beginn der Arbeit grundlegende Kenntnisse vorhanden. Diese lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Die Hemmstoffe der Transkription können in zwei Hauptklassen unterteilt werden: a) die Klasse der Stoffe, die direkt an die DNA-Vorlage ("template") assoziieren, und dadurch deren biologische Aktivität ändern, und b) die Klasse der Verbindungen, welche primär mit den Transkriptionsenzymen reagieren und diese inaktivieren. Die von uns untersuchten Chromoglykoside gehören zu der ersten Klasse. Wie auch die Actinomycine binden sie sich nicht kovalent an DNA. Sie können aus ihren Komplexen mit DNA in bestimmten organischen Lösungsmittelsystemen wieder extrahiert werden.

Verschiedene Typen dieser nicht-kovalenten Wechselwirkung werden diskutiert: Wechselwirkungen, die spezifische funktionelle Gruppen oder Sekundärstrukturelemente der DNA voraussetzen; Wechselwirkungen, die zweiwertige Kationen oder eine vorherige Aktivierung der Partner benötigen; Komplexe, in denen das Hemmstoffmolekül an der äußeren Oberfläche der DNA fixiert ist, und solche, in denen es sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einschleibt (Intercalation).

Nach den bisherigen Befunden zeigen die Antibiotika der Chromomycin-Gruppe (Chromomycine, Mithramycine, Olivomycine) und die Mitglieder der Daunomycin-Gruppe (Daunomycine, Nogalamycine, Cinerubine u. a.) innerhalb der Gruppen ähnliche Wechselwirkungstypen mit der DNA, von Gruppe zu Gruppe aber verschiedene. Über diese Komplexe war bekannt (zusammenfassender Literatur: GOLDBERG und FRIEDMANN, 1971):

a) es liegt Bindung vor - die Antibiotika sedimentieren gemeinsam mit der DNA in der analytischen Ultrazentrifuge.

b) Die Mitglieder der Daunomycin-Gruppe (Anthracycline) zeigen alle Anzeichen für einen intercalierenden Bindungsmodus: Wenn sie sich an native doppelsträngige DNA binden, verringern sie die Schwebedichte (buoyant density) der DNA im Sedimentationsgleichgewicht im CsCl oder Cs₂So₄ -Dichtegradienten. Der Sedimentationskoeffizient der DNA wird verringert und ihre Viskosität erhöht. Zirkuläre intern verdrehte DNA-Moleküle werden bei der Komplexbildung aufgedreht. Die Bindung dieser Antibiotika an DNA scheint jedoch noch stärker zu sein, als es durch den Einschub zwischen die Basenpaare (Intercalation) allein erklärt werden könnte: die Anthracyclin-DNA-Komplexe bleiben selbst bei hohen Ionenstärken und hohen Temperaturen noch intakt. Daraus resultiert ein Anstieg in der Schmelztemperatur der komplexierten DNA. Die Aminosuckerreste des Daunomycins scheinen verantwortlich zu sein für die Stabilisierung des Komplexes, da die Affinität des Antibiotikums für DNA nach N-Acetylierung des Zuckerrests merklich herabgesetzt wird. Nogalamycin Derivate ohne die Nogalose-Seitenkette sind wesentlich weniger aktive Hemmstoffe und binden sich wesentlich schlechter an DNA. Die Bindung der Antibiotika an DNA steigt mit dem GC-Gehalt der DNA, gemessen durch die Änderung der Schwebedichte.

c) Die Mitglieder der Chromomycin-Gruppe dagegen scheinen nicht zu intercalieren. Zwar wird auch hier die Schwebedichte der komplexierten DNA erniedrigt aber dies geht nicht einher mit einer Änderung der Viskosität oder des Sedimentationskoeffizienten. Die Schmelztemperatur der DNA wird erst bei sehr hohen Antibiotikakonzentrationen heraufgesetzt. Intern verdrehte zirkuläre DNA-Moleküle werden bei der Komplexbildung nicht aufgedreht. An DNA mit doppelsträngiger Helixstruktur wird sehr viel mehr Antibiotikum gebunden als an denaturierte DNA. Die Bin-

dung erfolgt spezifisch an Guanin oder guaninreiche DNA-Abschnitte. Diese Spezifität ist auf den Chromophor-Teil des Moleküls zurückzuführen. Die Festigkeit der Bindung an DNA wird auch hier wesentlich von den Zuckerseitenketten bestimmt: Derivate mit weniger Zuckerresten sind biologisch weniger aktiv und dissoziieren schneller von der DNA wieder ab. Die Chromomycine binden in Form eines Mg^{2+} -Komplexes an DNA. Die Anlagerung geschieht relativ langsam (innerhalb ca. 30 min.). Es wird vorgeschlagen, daß sich das Molekül von außen in einer der beiden Gruben der DNA anlagert (GOLDBERG und FRIEDMANN, 1971). Die Zuckerseitenketten würden dabei in ausgestrecktem Zustand einen Abschnitt von etwa drei bis vier Basenpaaren auf der DNA abdecken. Dies könnte erklären, warum auch bei sehr GC-reicher DNA oder einem $dG_n.dC_n$ Homo-Copolymer nicht mehr als ein Antibiotikum-Molekül pro vier Basenpaare gebunden wird. Ein genaueres Modell über die Wechselwirkung besteht jedoch noch nicht.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde die Problemstellung wie folgt präzisiert: (1) Welche Hinweise ergeben sich aus zirkulardichrographischen Messungen über Basenpräferenzen bei der Bindung der genannten Antibiotika an DNA und die Beteiligung von Metallionen an der Wechselwirkung? (2) Kann durch CD-Messungen Aufschluß erhalten werden über den Bindungsmechanismus. Zur Beantwortung der Frage (2) sollten vergleichende Studien mit Proflavin und Ethidium-Bromid durchgeführt werden, von denen bekannt war, daß sie intercalieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Methoden

Eine Vielzahl physikalisch-chemischer Untersuchungsmethoden können Aussagen über Struktureigenschaften von

Antibiotika-DNA-Komplexen liefern. Zur umfassenden Charakterisierung eines Komplexes sind die spezifischen Aussagen aus allen Untersuchungen in Betracht zu ziehen. Der Zirkulardichroismus (CD) wurde ausgewählt, weil er Konformationsuntersuchungen in wässriger Lösung erlaubt. Die Methode ist besonders sensibel zum Erfassen von Konformationsänderungen und hat eine große Aussagebreite. Den Ausschlag für die Wahl dieser Methode gab die zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit gehegte Hoffnung, die erhaltenen spektroskopischen Meßdaten am ehesten von allen Methoden mit den quantitativen Vorhersagen der Quantentheorie vergleichen und damit "verstehen" zu können. Die Anwendung der Quantentheorie auf biologische Moleküle ist einer der spezifischen Beiträge, den ein Physiker zur Lösung spezieller biochemischer Probleme erbringen kann. Antibiotika eignen sich als Objekt besonders, da sie zu den kleinen Molekülen auf der Skala der Molekularbiologie gehören. Die Ergebnisse quantenmechanischer Berechnungen sind aber derzeit umso fruchtbarer mit den Meßergebnissen zu vergleichen um diese ^{zu} interpretieren, je kleiner die betrachteten Moleküle sind.

2.1.1 Prinzipien der Meßmethode: Zirkulardichroismus

Zirkulardichroismus ist eine Erscheinungsform der optischen Aktivität von Materie bei ihrer Wechselwirkung mit einem elektromagnetischen Wellenzug definierter Polarisationsrichtung. Die optische Aktivität ist eine Begleiterscheinung einer Asymmetrie der betrachteten Moleküle. Dabei ist der Begriff der Asymmetrie nicht beschränkt auf den Typ, der für asymmetrische C-Atome geläufig ist. Optische Aktivität - im hier verwandten allgemeineren Sinne als Grundlage von zirkulardichroischen Eigenschaften - kann auch ein Molekül ohne asymmetrische C-Atome

besitzen. Voraussetzung für optische Aktivität ist, daß das Molekül keine Symmetrieebene und kein Symmetriezentrum besitzt. Noch allgemeiner ausgedrückt: das Molekül darf keine Rotations-Inversionsachse S_n besitzen. Diese Voraussetzung ist u. a. bei Makromolekülen mit Helixkonformation wie z. B. DNA erfüllt. Sie haben zwar einen gewissen Typ von Molekül-Symmetrie - die Helixsymmetrie - sie sind aber doch aufgrund des Fehlens der genannten Symmetrieelemente hinreichend asymmetrisch, um optische Aktivität und damit Zirkulardichroismus zu zeigen. Demgegenüber sind fast alle biologisch interessanten Makromoleküle optisch aktiv (RNA, Proteine, etc.).

Auch bei vielen kleineren Molekülen, wie z. B. den Chromoglykosid- oder den Tetrazyklinantibiotika fehlen Symmetrieebene und Symmetriezentren, so daß auch sie optisch aktiv sind. Flache Moleküle wie Ethidium-Bromid oder die Aminoacridine (Acridinorange, Proflavin etc.) dagegen besitzen eine Symmetrieebene und sind daher im freien Zustand nicht optisch aktiv. Sie sind nicht "inhärent" optisch aktiv. Werden solche Moleküle in einen asymmetrischen größeren Molekülverband eingelagert, so kann in ihnen optische Aktivität induziert werden. Prinzipiell kann dieses Phänomen nur quantenmechanisch exakt beschrieben werden. In den Zustandsfunktionen (ψ -Funktionen) der Elektronenhülle dieser nicht inhärent optisch aktiven Moleküle wird durch die asymmetrische Umgebung eine Asymmetrie induziert. Dieser Vorgang muß nicht notwendig mit einer Verformung des Atomgerüsts des Moleküls einhergehen (Kernkoordinaten). Das Molekül kann nach wie vor planar bleiben. Lediglich die Zustandsfunktion der Elektronen erhält durch ihre Wechselwirkung mit der Umgebung einen gewissen Grad an Asymmetrie. Bei der Wechselwirkung mit polarisiertem Licht äußert sich diese Asymmetrie auch

in den Elektronenübergängen des eingelagerten Moleküls, die es durch das polarisierte Licht angeregt ausführt. Das bedeutet induzierte optische Aktivität. Auf diese Weise wird auch in den Elektronenübergängen der Basenpaare doppelsträngiger nativer DNA optische Aktivität induziert, obwohl die Basenpaare planare Systeme ohne inhärente optische Aktivität sind. Die optische Aktivität manifestiert sich danach - soweit es die Betrachtung unter Vernachlässigung ^{dis-}persiver Phänomene erlaubt, - in den Elektronenübergängen, die das Molekül als Antwort auf die Anregung durch das Licht ausführt, d. h. in den Absorptionsbanden der Chromophore eines Moleküls. Zirkulardichroismus ist ein Phänomen der Lichtabsorption optisch aktiver Moleküle.

In meßbaren Größen ausgedrückt, läßt sich Zirkulardichroismus definieren als die durch optische Aktivität verursachte Fähigkeit eines Chromophors, rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht in unterschiedlicher Weise zu absorbieren. Daraus ergibt sich sofort eine Meßvorschrift: man messe die Extinktion E einer Probelösung optisch aktiven Materials einmal in einem Lichtstrahl aus monochromatischem links-zirkular polarisiertem Licht: $E^l(\lambda)$, sodann in einem Strahl aus rechts-zirkular polarisiertem Licht: $E^r(\lambda)$, bilde die Extinktionsdifferenz: $(E^l - E^r)_\lambda = \Delta A_\lambda$ und rechne auf den differentiellen molekularen Extinktionskoeffizienten zurück: $\Delta \epsilon(\lambda) = \Delta A(\lambda) / c \cdot d$. Diese Rechnung geschieht in der gleichen Weise wie die Berechnung eines üblichen molekularen Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ aus einer gemessenen Extinktion durch Division mit dem Produkt aus molarer Konzentration des gelösten absorbierenden Materials (c) und der Schichtdicke in cm (d). $\epsilon(\lambda)$ ist nichts anderes als die Summe der molekularen Extinktionskoeffizienten für rechts und links zirkular polarisiertes Licht bei Anre-

gung mit linear polarisiertem Licht.

$$\epsilon(\lambda) = (\epsilon^l + \epsilon^r)_\lambda \quad \text{gewöhnliche Absorption}$$

$$\Delta\epsilon(\lambda) = (\epsilon^l - \epsilon^r)_\lambda \quad \text{Zirkulardichroismus}$$

Dies gilt, weil ein linear polarisierter Wellenzug als aus einem rechts- und einem links-zirkular polarisierten Wellenzug gleicher Frequenz, Amplitude und Phase zusammengesetzt betrachtet werden kann. Dadurch wird die oben angegebene Meßvorschrift für die tatsächliche Messung in kommerziellen Geräten vereinfacht (Abb. 2). Ein von der Lichtquelle S, dem Monochromator M und dem Polarisatorkristall P erzeugter linear polarisierter Wellenzug wird in einem Modulatorkristall X in rechts- und links-polarisierte Wellenzüge zerlegt abwechselnd im Rhythmus einer an den Modulator angelegten Sinusspannung. Beide Komponenten durchsetzen die Küvette C mit der Probe und treffen anschließend auf die Photomultiplier-Röhre PM auf. Die vom Photomultiplier angezeigte Extinktion der Probe wird ebenfalls im Rhythmus der Modulator-Sinusspannung schwanken, wenn die Probe optisch aktiv ist und rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert.

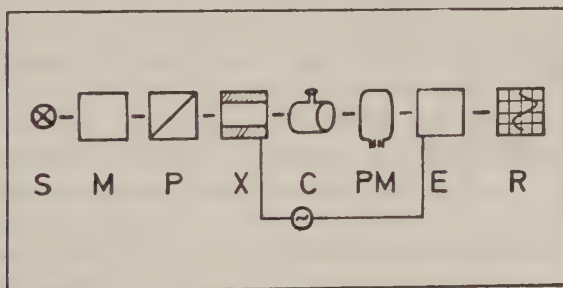


Abb. 2

Blockschema eines Zirkulardichrographen

In der nachgeschalteten Elektronik El wird das modulierte PM-Ausgangssignal in die Extinktionsanteile für rechts und links - zirkular polarisiertes Licht zerlegt und ΔA_λ wird vom Schreiber R registriert.

Ebenso wie die Absorption eines Chromophors eine Funktion der anregenden Wellenlänge ist, so ist es auch sein Zirkulardichroismus (CD). Man kann ganze Spektren $\Delta A = f(\lambda)$ aufnehmen (oder $\Delta \epsilon = f(\lambda)$), sog. CD-Spektren. Während aber die Extinktion nur positive Werte annehmen kann: $(\epsilon^l + \epsilon^r) \geq 0$ weil $\epsilon^l, \epsilon^r \geq 0$, kann der Zirkulardichroismus positive und negative Werte annehmen, je nachdem ob in einer Absorptionsbande $\epsilon^l > \epsilon^r$ oder $\epsilon^l < \epsilon^r$ ist. (Abb. 3)

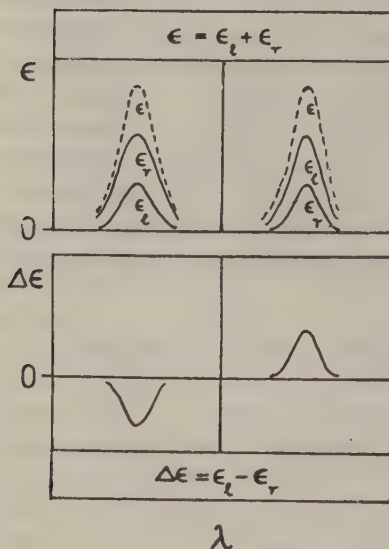


Abb. 3

Zustandekommen positiver und negativer Banden in einem CD-Spektrum

CD-Spektren enthalten sehr sensible Information über die Konformation einer optisch aktiven Substanz. Dieses ist

die Konsequenz der dem Phänomen zugrunde liegenden Sensibilität der Symmetrie der Elektronenzustände auf Konformationsänderungen. Ein Absorptionsübergang eines Chromophors wird in der Quantenmechanik charakterisiert durch seine Übergangsmomente. Ein elektrisches Dipolmoment $\vec{m}_e$ ist in der klassischen Elektrostatik ein Charakteristikum einer asymmetrischen räumlichen Ladungsverteilung. Es ist das Produkt aus dem Abstandsvektor $\vec{r}$ der Schwerpunkte der positiven und negativen Ladung q in der Verteilung: $\vec{m}_e = q \cdot \vec{r}$

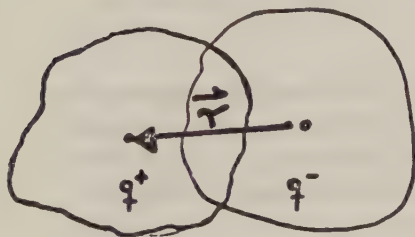


Abb. 4

Elektrisches Dipolmoment

Analog kann für einen Elektronenübergang als Antwort auf eine anregende Strahlung ein elektrisches Dipolmoment definiert werden als das Produkt aus dem Abstandsvektor der Ladungsschwerpunkte des wechselwirkenden Elektronensystems im Ausgangs- und im angeregten Zustand und der Größe der Ladung. Ein magnetisches Dipolmoment $\vec{\mu}_{mag}$ ist in der klassischen Elektrodynamik eine Begleiterscheinung eines gerichteten Ladungsflusses auf einer geschlossenen Bahn. Analog kann für einen Elektronenübergang eines Moleküls als Antwort auf die anregende Strahlung die Verschiebung der Ladungsanordnung zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand als ein Ladungsfluß beschrieben werden. Wenn der

Übergang in einem asymmetrischen Molekülgerüst stattfindet, kann man ihn - klassisch veranschaulicht - so beschreiben, als ob er auf einem gekrümmten Weg stattfindet mit einem zugeordneten magnetischen Dipolmoment $\vec{\mu}_{mag} \neq 0$.

Die für das Absorptionsverhalten eines Chromophors bestimmende Größe ist das elektrische Dipolmoment allein. Die Absorptionsintensität einer Absorptionsbande wird gemessen durch ihre Dipolstärke, ein Maß für die Fläche unter der Absorptionsbande. Die Dipolstärke ist gegeben durch das Quadrat des elektrischen Dipolmoments des Überganges.

$$D = |\vec{m}_{el}|^2$$

Die für die optische Aktivität eines Übergangs verantwortliche Größe ist die sogenannte Rotatorstärke R . Ein Maß dafür ist die Fläche unter einer CD-Bande. R ist gegeben durch das Produkt aus elektrischem und magnetischem Dipolmoment des Überganges:

$$R = \vec{m}_{el} \cdot \vec{\mu}_{mag}$$

Quantenmechanisch wird diese Größe berechnet als der Imaginärteil des Matrixelements des skalaren Produktoperators aus elektrischem und magnetischem Dipolmoment zwischen dem Grundzustand und dem Endzustand des Überganges:

$$R_{if} = \text{Im} \left\{ \langle \psi_i | \hat{\mu}_{mag} | \psi_f \rangle \cdot \langle \psi_f | \hat{m}_{el} | \psi_i \rangle \right\}$$

Für Moleküle mit Symmetrieelementen S_n wird $R = 0$. Daher wird klar, warum nur Moleküle ohne diese Symmetrieelemente optische Aktivität besitzen.

Zwischen R und der Meßgröße $\Delta\epsilon$ bestehen folgende Zusammenhänge:

- a) die Form des CD-Spektrums in Funktion der Rotatorstärken der einzelnen Banden wird beschrieben durch

$$\Delta\epsilon(\nu) = \nu \cdot \sum_k R_k f(\nu - \nu_k) \quad (1)$$

wobei $f(\nu - \nu_k)$ die Funktion ist, die die Form der k -ten zugehörigen Absorptionsbande analytisch beschreibt und R_k die Rotatorstärke der zugehörigen CD-Bande.

- b) Die Rotatorstärke einer Bande ergibt sich aus der Fläche der Bande im CD Spektrum, also aus der Integration der Bande nach:

$$R_k = \text{num. Fakt} \times \int_{\lambda_k}^{\lambda_2} \frac{\Delta\epsilon(\lambda)}{\lambda} d\lambda$$

Aus der physikalischen Zusammensetzung der beiden Größen Dipolstärke D und Rotatorstärke R kann man sehen, warum der Zirkulardichroismus eine sensiblere Meßgröße für die Konformation eines Chromophors ist, als seine Absorption. In die Absorption geht nur der Betrag, nicht die Richtung des elektrischen Dipolmomentvektors ein. In den Zirkulardichroismus gehen Beträge und relative Orientierung der elektrischen und magnetischen Übergangsmomentvektoren zueinander ein. Eine geringe Verformung der Molekülsymmetrie (Konformationsänderung) kann durchaus die Absorption eines Chromophors unverändert lassen, während sein Zirkulardichroismus sensibel darauf reagiert: durch Änderung von Größe und Lage oder auch nur der Lage der Übergangsmomente zueinander. Als ein Beispiel dafür mögen DNA und RNA gelten, die sich in ihren Absorptionsbanden nur geringfügig unterscheiden, in ihren CD-Banden jedoch ganz

charakteristisch, und andererseits die kleinen Farbstoffmoleküle wie etwa Proflavine, in deren Übergängen durch bloße Einlagerung in das Helixgerüst der DNA gut meßbare CD-Effekte induziert werden.

2.1.2 Meßgrößen und Information

Meßgrößen sind: Lage, Intensität und Vorzeichen der CD-Banden; das Verhältnis der Intensitäten von CD-Banden und zugehöriger Absorptionsbande (Dissymmetriefaktor g) und schließlich die Gestalt des CD-Spektrums: Struktur von Bandengruppen, konservativer Charakter, Doublettstruktur. Die Lage der CD-Banden stimmt grundsätzlich überein mit der Lage der zugeordneten Absorptionsbanden der chromophoren Gruppen eines Moleküls. Sie kann zur Identifizierung von funktionellen Gruppen eines unbekannten Moleküls herangezogen werden. Bandenverschiebungen bieten dergleichen Typ von Information wie in der Absorptionsspektroskopie. Für die Bandenintensitäten und Vorzeichen besteht keine so enge Korrelation zur Absorption: es gibt starke Absorptionsbanden mit geringer Rotatorstärke und umgekehrt. Aus der absoluten Intensität der Rotatorstärke erhält man Information über die Natur des Elektronenüberganges, der zu betrachteten CD-Bande führt, also etwa $n \rightarrow \pi^*$ oder $\pi \rightarrow \pi^*$. Inhärent asymmetrische Chromophore (Fehlen der S_n -Symmetrieelemente) mit typischen Größenordnungen für m_d von ca. 10^{-18} cgs-Einheiten und für μ_{mag} von ca. 10^{-20} cgs-Einheiten besitzen Rotatorstärken von der Größenordnung $R = \text{ca. } 10^{-38}$ cgs-Einheiten. Dagegen zeigen inhärent symmetrische Chromophore, die nur durch asymmetrische Umgebung eine induzierte optische Aktivität erhalten, nur Rotatorstärken von ca. 10^{-42} bis 10^{-40} cgs-Einheiten.

Damit kann aus der Intensität einer CD-Bande bereits der Ursprung der Asymmetrie eines Chromophors, die Größe und manchmal auch die Richtung der Übergangsmomente abgeschätzt werden. Zwischen alternativen Geometrievorschlängen für einen Chromophor kann damit oft bereits diskriminiert werden.

Für die CD-Banden inhärent asymmetrischer Chromophore stellen zusätzliche, durch die Umgebung induzierte Asymmetrien, nur um eine oder mehrere Größenordnungen kleinere Störungen dar. Damit können die für solche Chromophore gemessenen Rotatorstärken und ihre Vorzeichen zu einer Aufklärung der Absolut-Konfiguration herangezogen werden. Dies ist allerdings erfolgreich durchführbar nur in solchen Fällen, in denen mit Hilfe der Quantentheorie genügend sichere Vorhersagen über die Vorzeichen der Banden gemacht werden können, die mit den gemessenen Vorzeichen verglichen werden können. Zum Beispiel war es auf diese Weise möglich, zwischen zwei vorgeschlagenen alternativ möglichen Konfigurationen des 1,3-Diphenylallen zugunsten der S-Konfiguration für das im Sichtbaren rechtsdrehende Isomer zu entscheiden (MOSCOWITZ, 1967). Ebenso konnte zwischen zwei alternativ möglichen Helicitäten des Dien-Chromophors in dem in Abb. 5 gezeigten Molekül auf Grund der Vorzeichenanalyse zugunsten der (+) trans 9 methyl 1,4,9,10 Tetrahydronaphthacen-Konfiguration entschieden werden.

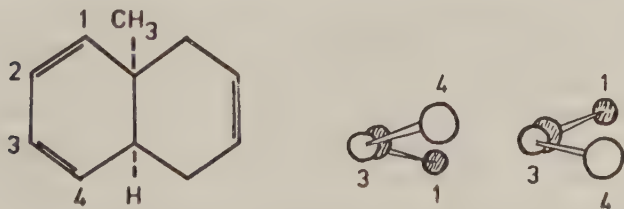


Abb. 5

Zwei denkmögliche Konfigurationen des Dien-Chromophors

Für die CD-Banden inhärent symmetrischer, asymmetrisch perturbierter Chromophore waren bisher absolute Konfigurationsaussagen nicht möglich, da die Rotatorstärken hier wegen des kleinen Betrags von m_d sehr sensibel auf die Änderungen der Symmetrie des äußeren induzierenden Molekülgerüsts, und damit auf Lösungsmittel, Temperatur, Ionenstärke und pH-Effekte reagieren. Gerade dieser Sachverhalt aber läßt sich ausnutzen zu Relativ-Aussagen über die Konformationsverhältnisse in einer Reihe von Verbindungen mit gemeinsamen Chromophor und variablen Substituenten. Das bestbekannte Beispiel ist der Carbonyl-Chromophor in gesättigten Kohlenwasserstoff-Ketonen. Er besitzt eine schwache Absorptionsbande ($\epsilon \approx 20$) bei 300 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Die Beiträge von Substituenten in der Nähe des Chromophors zur Rotationsstärke des Überganges hängen ab von ihrer chemischen Natur und ihrer sterischen Anordnung in Bezug auf die beiden Symmetrieebenen der Carbonylfunktion. Mit Hilfe der empirischen Oktantenregel ist es in vielen Fällen möglich aus dem Vorzeichen der in diesem Übergang induzierten Rotatorstärke einen Rückschluß auf die chemische Natur und die räumliche Anordnung der Substituenten relativ zum Chromophor zu ziehen. Bei solchen schwachen Absorptionsbanden ($m_d \approx 0$) erlauben die CD-Messungen ferner vielfach die Abschätzung der Größe magnetischer Übergangsmomente.

Speziell für helicale Polynucleotide ist die Form des CD-Spektrums eine aufschlußreiche Meßgröße. Die Gestalt des CD-Spektrums nativer DNA ist die einer flach liegenden symmetrischen S-Kurve (Abb. 6 a). Im CD-Spektrum der RNA ist die positive Bande stärker und die negative Bande sehr viel schwächer ausgeprägt (Abb. 6 b). (Nicht-konservativer Typ). Diese Unterschiede werden der ver-

schiedenen Neigung (engl. "tilting") der Basen in Bezug auf die Stapelachse zugeschrieben.

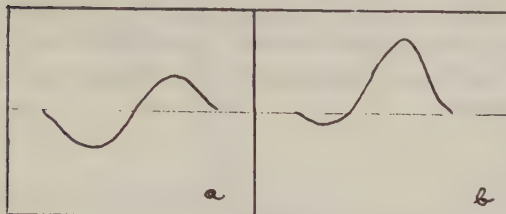


Abb. 6
CD-Spektren von a)
DNA und RNA schematisiert.

Aus der Gestalt von CD-Spektren konnte geschlossen werden, daß Oligoribonucleotide in Lösung unter geeigneten Bedingungen eine helicale Einstrangstruktur mit Basenstapelung bilden können. Auch der Effekt einer Basenpaarung ist aus CD-Spektren zu ersehen. So ist es etwa möglich, die Bildung von Einstrang, Zweistrang und Dreistrang-Helices (z. B. poly C., poly A.poly U., poly A. 2polyU) zu unterscheiden. Daß die CD-Spektren für solche dissymmetrischen Helices charakteristische Merkmale aufweisen, die wieder verschwinden, wenn diese Konformation zerstört wird, ließ sich zum Studium der Stabilität solcher Konformationen ausnützen. Aus der Messung der Temperaturabhängigkeit des Zirkulardichroismus von einsträngigen Polynucleotiden ergaben sich nicht nur thermodynamische Gleichgewichtskonstanten sondern auch, daß dem "Schmelzen" dieser Einstrangstrukturen ein nicht-kooperativer Charakter zukommt. Im Gegensatz hierzu ist das Schmelzen von Doppelstrang- oder Mehrstrang-Helices ein von der Kettenlänge abhängiger, kooperativer Prozeß. Die theoretische Behandlung des Zirkulardichroismus helikaler Strukturen ist im Vergleich zur Theorie der optischen Aktivität anderer biologischer Makromoleküle sehr

weit fortgeschritten. Für native DNA in der B-Konformation konnten Vorhersagen über Form und Intensität der CD-Spektren gemacht werden, die in befriedigender Weise mit den gemessenen Spektren übereinstimmten (JOHNSON und TINOCO, 1969). Gutes theoretisches Verständnis ist Voraussetzung zur weiteren Extraktion von Information aus experimentellen Daten.

2.1.3 Meßtechnik

Die Messungen wurden durchgeführt an einem Jouan Dichrographe II (Organisch Chemisches Institut der Universität Bonn, Dr. G. Snatzke und Biochemistry Department, Universität Oxford, Dr. I.O. Walker) und mit einem Cary 60 Spektropolarimeter mit CD-Zusatz (Physikalisch Chemisches Institut der Universität Würzburg, Dr. Kuball). Da der Zirkulardichroismus in beiden Geräten am durchfallenden Licht gemessen wird (Abb. 2) soll die Probenextinktion Werte von ca. 1,5 Ext.Einheiten in zu messenden Wellenlängenbereich nicht überschreiten. Optimale Meßgenauigkeit wird erreicht für Extinktionen zwischen 0.5 EE und 1.2 EE. Die Antibiotika- und DNA-Konzentrationen mußten daher so gewählt werden, daß dieser Extinktionsbereich nach Möglichkeit eingehalten wurde (Abb. 7). Da die untersuchten Antibiotika jedoch über den breiten interessierenden Spektralbereich stark variierende Absorptionen aufweisen, war diese Bedingung mit einer einzigen Küvetten-schichtdicke i.A. nicht im ganzen Spektralbereich erfüllbar. Es wurde daher mit Küvetten variabler Schichtdicken (Suprasil, Fa. Hellma) von 20 mm, 10 mm, 5 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0,5 mm gearbeitet und das Spektrum in zwei bis drei Teilabschnitten mit verschiedenen Küvetten aufgenommen. Diese wurden so gewählt, daß in dem mit ihnen bearbeiteten Bereich die oben genannte Bedingung erfüllt war. Beide Ge-

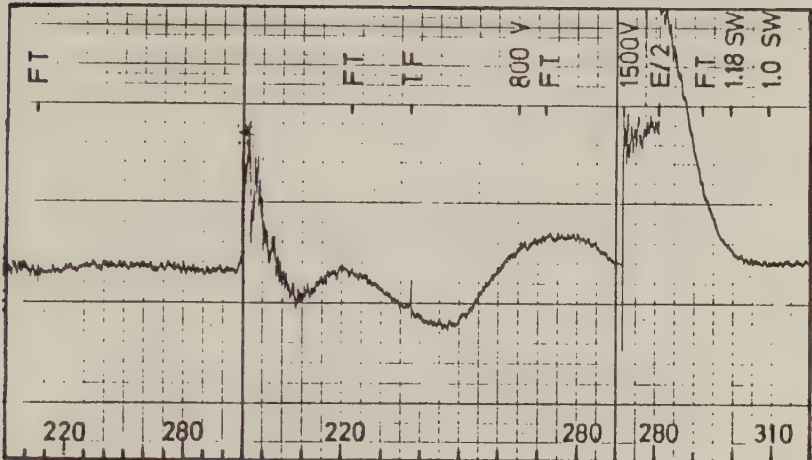


Abb. 7

DNA-Konzentration 400 µg/ml in einer 0.5 cm Küvette (rechts) u. in einer 0.1 cm Küvette (mitte u. links). Kleine Elongationen. Meßempfindlichkeitsoptimum überschritten. Daher verzerrtes Spektrum. Peakhöhenverhältnisse nicht exakt.

räte zeigen die momentane Spaltbreite des Eingangsspalts und die Anodenspannung des Photomultipliers an. In beiden Geräten werden diese Größen über einen Servomechanismus bzw. über ein eingebautes Spaltprogramm der momenta-

nen Probenextinktion angepaßt. Die Eingangsspaltweite bestimmt die spektrale Bandbreite des zur Messung verwendeten Lichts und damit das Auflösungsvermögen. Der

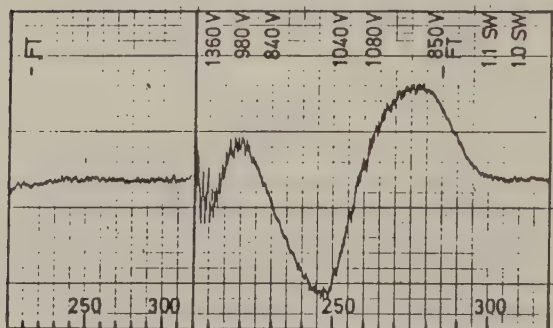


Abb. 8

DNA-Konzentration 160 $\mu\text{g/ml}$ in einer 0.5 cm Küvette
 $\text{Ext}(260) = 1.6 \text{ EE}$. Guter Meßempfindlichkeitsbereich.
 Hohe (gut meßbare) Elongationen auf dem Schreibpapier
 im empfindlichsten Bereich ($E=1$) bei zulässigen Spannungen am Photomultiplier. Spektrum nicht mehr verzerrt.
 FT := Umschalten vom Spalbreiten- auf den Spannungservomechanismus. SW: = Spaltweite in mm. Links: Nulllinie der Küvette nach der Messung. Der Rauschpegel erreicht sein Maximum in den Absorptionsbanden der DNA bei 260 nm und bei 220 nm.

Operator hat anhand einer vom Gerätehersteller gelieferten Eichkurve Spaltbreite-Bandbreite und anhand der Linienbreiten in den Spektren seiner jeweiligen Probe zu entscheiden, bis zu welchen Spaltbreiten er gehen kann. Der Küvettenwechsel wird vorgenommen, wenn die so gefundene größte zulässige Spaltbreite bzw. Anodenspannung überschritten wird. Die Teilbereiche des Spektrums werden überlappend aufgenommen. Für jede Küvette wird vor und nach Messung der Probenreihe die Nulllinie registriert. Abbildungen 7 und 8 demonstrieren die Wahl der richtigen Probenkonzentrationen und der passenden Küvette. Abb. 9 zeigt die Va-

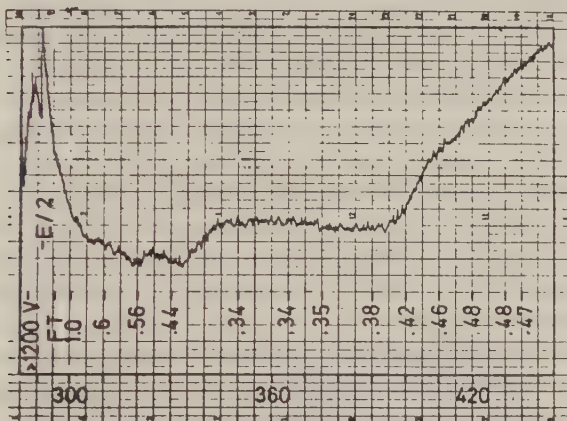


Abb. 9

Mithramycin-DNA-Komplex in einer 0.5 cm-Küvette.

Die Spaltbreiten sind dort am größten, wo die Extinktion der Probe am größten ist: bei ~ 420 nm und bei ~ 330 nm.

Durch die Gegenwart der DNA und deren große Extinktionen bedingt kann für < 290 nm mit dieser Küvette nicht weitergemessen werden, obwohl die Empfindlichkeit der Anlage noch reduziert werden könnte und auch die CD-Amplituden im Prinzip nicht zu groß würden. Da auch die Konzentrationsverhältnisse im Komplex nicht zurückgenommen werden können, ohne einen Verlust der ohnehin nicht großen CD-Amplituden, bleibt nur die Wahl einer kleineren Küvettschichtdicke übrig.

riation der Spaltbreite in Funktion der Extinktion einer "Mithramycin-DNA-Probe". In Einzelfällen wurden Fehlweisungen der Geräte bis zu 30 % bei Verwendung einer ungeeigneten Spaltbreite gefunden, die durch Wahl einer geeigneten Küvettenschichtdicke zu vermeiden waren. Da die Liniensbreiten aber meistens in der Größenordnung von 10 nm bis 20 nm lagen und die spektralen Bandbreiten in der Größenordnung von 3 bis 5 nm, konnte in den meisten Fällen der Arbeitsbereich des Servomechanismus voll ausgenutzt werden. Größere Meßfehler treten leicht unbemerkt auf bei Wahl einer falschen Zeitkonstante und einer falschen Registriergeschwindigkeit. Bei allen unseren Messungen wurde versucht, die Grundregel der Spektroskopie zu beachten, daß nämlich die Zeit der Passage durch die schmalste Linie noch mindestens zehnfach länger ist als die verwendete Zeitkonstante der Elektronik. So wurde etwa beim Jouan-Gerät meist mit einer Registriergeschwindigkeit von 0.125 nm/sec bei einer Zeitkonstante von $\tau=2$ sec gearbeitet oder gelegentlich in Spektralbereichen ohne CD-Banden mit 0.25 nm/sec bei $\tau=1$ sec. Die Grundregel ist also in beiden Fällen reichlich erfüllt. Andererseits wurde die Zeitkonstante in den erlaubten Grenzen möglichst groß gewählt, um ein optimales Signal/Rauschverhältnis auf der Registrierpapier zu erzielen. Beim Cary-Gerät wurde mit 50 nm/min gearbeitet mit $\tau=1$ sec. Der Küvettenraum wurde mit einem Durchflußthermostaten auf die Meßtemperatur stabilisiert.

In Abb. 10 werden anhand mehrfach übereinander registrierter Spektren die Signal/Rauschverhältnisse des Cary-Gerätes demonstriert. Zur besseren quantitativen Auswertung kleiner Amplituden im empfindlichsten Meßbereich (hoher Rauschpegel) erwies sich Mehrfachregistrieren und anschließendes Mitteln über drei bis fünf Spektren als ratsam. Dazu wurden die Messwerte gleichzeitig analog (Schrei-

berpapier) und digital (Datex Stanze mit 8 Kanal-Lochstreifen) ausgegeben. Die Analyse der Lochstreifen und das Auswerten der Rohdaten erfolgte an der CD 3300 Rechenanlage der Universität Erlangen-Nürnberg. Die Programme zur Auswertung sind im Anhang aufgeführt.

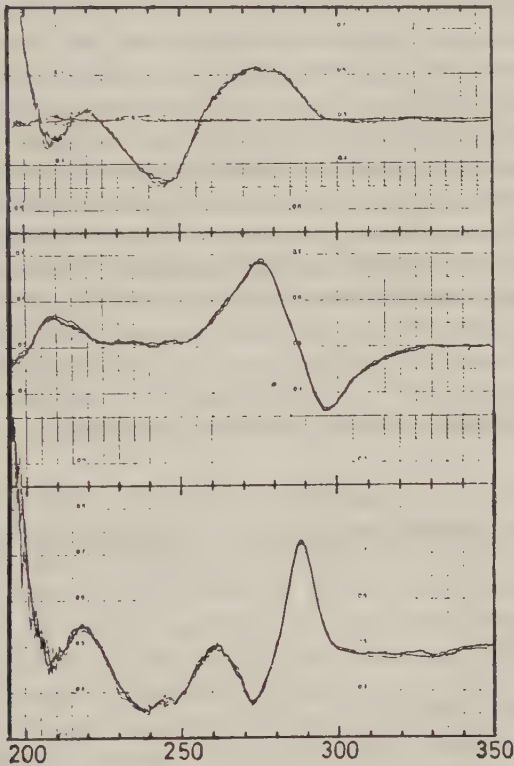


Abb. 10

Signal/Rauschverhältnisse im Bereich hoher Empfindlichkeiten beim CARY-Gerät, demonstriert am Beispiel oben: DNA allein., mitte: Chromomycin allein., unten: DNA-Chromomycin-Komplex. (Vergl. Abb. 48 a)

2.2 Material

2.2.1 DNA

Da die Abhängigkeit der CD-Spektren von DNA und DNA-Antibiotika-Komplexen vom (G+C)-Gehalt der DNA untersucht werden sollte, wurden folgende Bakterien mit DNA unterschiedlichen (G+C)-Gehaltes gezüchtet: *E. coli* 9637, *B. subt.* W 23, *Sarcina lutea* und *Cytophage johnsonii* aus der Kultursammlung von Prof. W. und H. Kersten. Dr. Michael Foster, Institute of Microbiology, Universität Oxford, stellte uns eine frisch gezüchtete Charge von 24 g *Aerobacter aerogenes* zur Verfügung und Dr. Phizackereley, Oxford, eine frisch gezüchtete Charge von *B. megatherium*. Zum Vergleich mit den bakteriellen DNA-Spezies wurden folgende DNA-Proben nicht bakteriellen Ursprungs herangezogen: T7-Phagen DNA, zur Verfügung gestellt von A. Milner, Oxford. Kalbs-Thymus-DNA, Worthington, Charge No. 623. Heringssperm-DNA der Fa. Mack, Illertissen, Charge No. 108. Lachssperm-DNA von Sigma Chemicals, No. 74 B - 080 Type III. Die G+C-Gehalte dieser DNA-Proben sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle I

(G+C)-Gehalte von DNA-Spezies aus verschiedenen Organismen

DNA von	% (G+C)
<i>Sarcina lutea</i>	72
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Bacillus subtilis</i>	43.5
<i>Bacillus megatherium</i>	38
<i>Cytophaga johnsonii</i>	33
T7 Phagen	50
Heringssperm	43
Kalbsthymus	41-43
Lachssperm	41

Für die kommerziellen DNA-Chargen lagen folgende Spezifikationen vor: Mack :Feuchtigkeit 9.4 %, N-Gehalt 16.8 % P-Gehalt 10.45 %, N/P = 1.61, Hypochromer Effekt :150 %. Worthington: "Proteinfreie DNA".

Die kommerziellen Präparate konnten ohne weitere Deproteinisierungen direkt verwendet werden, da die Kontrolle des Extinktionsverhältnisses Ext 260/280 Werte ≥ 1.94 ergab.

2.2.2 Bakterien-Kulturbedingungen

E.coli wurde im Minimalmedium nach Sakaguchi, B.subt. im Minimalmedium nach Nakada (NAKADA, 1965) gezüchtet. Das Nährmedium für S.lutea war 8 g/liter Nutrient Broth (Difco), pH 7.0; für C.johnsonii wurde ein Medium mit 37 g/liter Micro Inoculum Broth (Difco) gewählt, 1 % Glucose, pH 7.0. Die Wachstumstemperatur für diesen Keim war 25°C, sonst 37°C.

2.2.3 DNA-Präparation nach Marmur (MARMUR, 1961)

Zell-Lysis mit Lysozym (E.C.3.2.1.17 muramidase) (500 µg/ml) und Na-Laurylsulfat (2.5 %). Extraktion der DNA aus Protein-Komplexen mit 1M Na-Perchlorat. RNA-Verdauung mit Pankreas-RNase (E.C.2.7.7.16) (100 µg/ml). Deproteinisierung (mehrfach) durch Ausschütteln mit Chloroform-Isoamylalkohol (2-Methyl-1-Butanol)-Gemisch 24:1 bis Ext. (260/280) > 1.92 . Fällung in Isopropanol. Typische Ausbeuten der Bakterienzüchtung in Gramm Feuchtgewicht (FG) pro Liter Erntesuspension und DNA-Präparationen sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II

Typische Ausbeuten von DNA-Präparationen aus Bakterien

Bakterien- ausbeute (gFG/l)	DNA-Ausb. ($\frac{\text{mg}}{\text{lg FG}}$)	Reinheit	$\frac{\text{E260}}{\text{E280}}$
B.subt.W 23	4.0	0.19	1.94
B.subt.W 23	6.0	0.8	1.93
E.coli 9637	5.2	0.77	1.93
S.lutea	3.8	0.6	1.98
S.lutea	5.8	0.76	1.97
C.johnsonii	4.8	2.0	1.91
E.coli Meth ⁻ zusammen	2.0 - 3.2	1.83 - 1.84	
B.subt.W 23 mit H.Wanke praepariert	1.0 - 1.5	1.84	

Bemerkungen zur Präparation

Die in der Tabelle zuerst aufgeführte Präparation aus B.subt. ergab nur eine niedrige Ausbeute, da die Puffer pH-Werte nicht gut kontrolliert waren und Verluste bei einem Zentrifugationsschritt zu Beginn der Präparation entstanden waren. Die anderen Präparationen ergaben re-produzierbare Ausbeuten von $(0.7 \pm 0.1 \text{ mg DNA/ g FG})$ bei dem relativ hohen Extinktionsverhältnis 1.94 ± 0.04 . Aus dem Vergleich zu den zwei gemeinsam mit H. Wanke durchge-führten Präparationen ist zu ersehen, daß der Gewinn im Reinheitsgrad von 1.84 auf 1.94 durch den Verlust von ca.

einem Drittel bis zur Hälfte des DNA-Materials erkaufte wird. Da jedoch für sinnvolle CD-Studien optimal proteinfreie DNA benötigt wird, mußten diese Verluste in Kauf genommen und durch Präparation von größeren Ausgangsmengen kompensiert werden. Marmur gibt für die Methode typische Ausbeuten von ca. 50 % der in der Zelle vorhandenen DNA an. Das entspräche für *E.coli* 1 - 4 mg DNA-Ausbeute pro 1 g Feuchtgewicht. Unsere Ausbeuten aus Ruhephase-Keimen liegen in der Größenordnung dieser Angabe. Die so präparierte DNA zeigte Sedimentationskoeffizienten $S_{20,W}^0$ von ca. (20 ± 10) S-Einheiten, entsprechend mittleren Molekulargewichten von ca. 20×10^6 dalton und besaß Transformationsaktivität. (H. WANKE, 1971). Diese Werte stimmen gut überein mit den Angaben von SZYBALSKI und OPARA-KUBINSKA (1965). Die praeparierten DNA-Fragmente haben eine Größe von ca. 1/40 bis 1/50 des gesamten *E.coli* Genoms ($MW 10^9$ dalton). Nach den Präparationsmethoden von SAITO und MIURA (1963) und ALBERTS und DOTY (1968) kann DNA mit höherer Transformationsaktivität und Ausbeute in weniger aufwendigem Verfahren erhalten werden, jedoch liefert die Methode nach MARMUR nach den Untersuchungen von SAITO und MIURA bei weitem die RNA-freieste DNA : $RNA/DNA = 0.1 \pm 0.05$; andere Methoden: RNA/DNA 0.7. Da es für unsere CD-Studien nicht auf Kettenlänge und Transformationsfähigkeit, sondern auf möglichst chemische Reinheit der DNA ankam, war für unsere Zwecke die Praeparationsmethode nach MARMUR die geeignetste. Lediglich für *Aerob. aerogenes* und *B.megaterium* ergaben sich bei der Praeparation Schwierigkeiten. Die Zellen von *Aerob.aerog.* lysierten unter den angegebenen Bedingungen nicht gut genug, und die DNA-Lösungen von *B.megaterium* sahen selbst nach Ausfällung der Proteine noch milchig aus. Diese Trübung war auf extrahier-

bare, fällbare Stoffwechselprodukte zurückzuführen. Sie konnte durch Dialyse gegen EDTA und eine Reinigungszen-
trifugation beseitigt werden. Aerob.aerog. kann besser
lysiert werden durch mehrfaches Einfrieren und Wieder-
auftauen nach der Lysozymbehandlung und Behandlung mit
Pronase (50 µg/ml), einer hochaktiven, nicht spezifischen
Proteinase. (SAITO u. MIURA 1963, W. MÜLLER 1971). Als
Summe aus unseren Erfahrungen mit der Präparationsmethode
würden wir heute lediglich die Deproteinisierung bei
höherem pH (8.8 - 9.0) in Gegenwart von 1 % SDS durch-
führen und durch einige Phenol-Extraktionsschritte ver-
kürzen (ALBERTS u. DOTY, 1968), ansonsten aber die Grund-
schritte nach MARMUR beibehalten.

Für CD-Messungen erwies es sich als unerlässlich, die so
präparierte DNA durch Dialyse gegen 10^{-3} M EDTA-haltigen
Puffer und anschließend gegen EDTA-freien Puffer zu rei-
nigen, da die Salzkonzentration im abschließenden Iso-
propanol-Fällungsschritt (0.3 M) hoch und eine Verschlep-
pung von Ionen trotz gründlichen Spülens der DNA in fri-
ischem Isopropanol unvermeidlich ist.

Antibiotika

Mithramycin wurde bezogen von Chas.Pfizer + Co., Maywood,
N.Y., U.S.A. Es wurden die Chargen NSC 24559 und 1071 -
246 - 2 benutzt. Chromomycin A3 wurde zur Verfügung gestellt
von Takeda Industries, Ltd., Hamburg. Lot No 126 + 127.
Nogalamycin erhielten wir von Upjohn Comp., Kalamazoo,
Michigan, U.S.A. Charge No. U-15,167., und 6741-THP-129-18.
Daunomycin wurde zur Verfügung gestellt von Drs. Arcamone
und DiMarco, Farmitalia, Mailand und Ethidium Bromid von
Dr.M.Waring, Cambridge.

Sonstige Materialien

DNase I Worthington, DCL 11 S 5613. ., Lysozym (E.C. 32117)
Serva, Heidelberg, No. 28260, 3x kristallisiert, reinst.

RNase (E.C. 2.7.7.16), 5x kristallisiert, reinst. aus Pankreas. Frei von Protease und DNase, Serva, Heidelberg, No. 34390. Sämtliche anderen Reagentien von Fluka, Serva und Merck, p.A.

3. RESULTATE

3.1 CD-Spektren von DNA allein

3.1.1 CD-Spektren von verschiedenen DNA-Spezies

Die CD-Spektren von DNA-Proben verschiedener Spezies (Abb. 11 A - 11 C) wurden zunächst rein empirisch auf ihre formalen Merkmale hin analysiert. Drei typische CD-Spektren von DNA-Spezies stark unterschiedlicher (G+C). Gehalte sind in Abb. 12 noch einmal zusammengestellt.

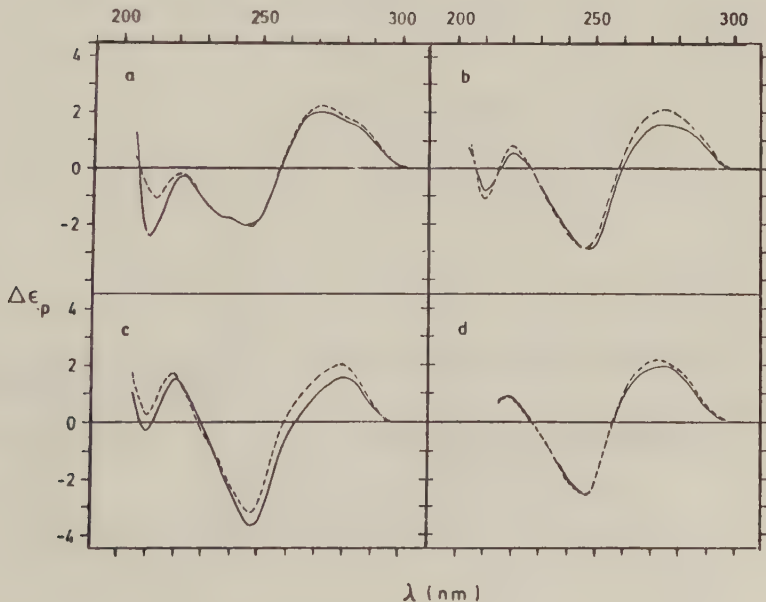


Abb. 11 A

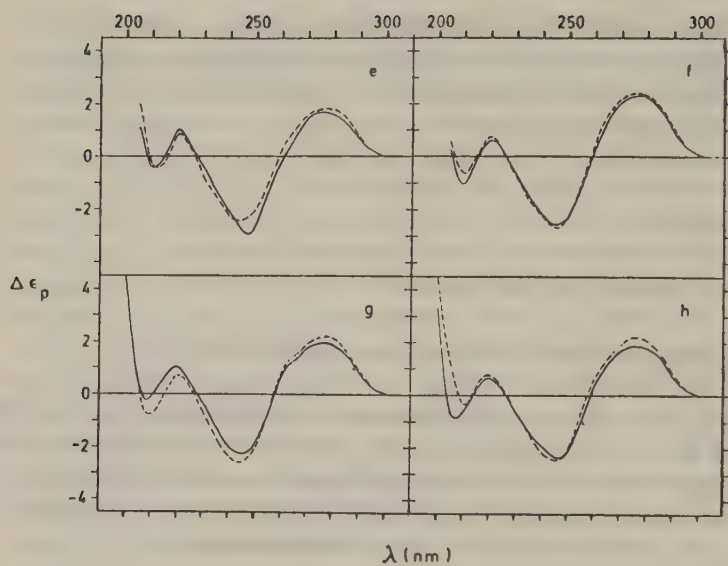


Abb. 11 B

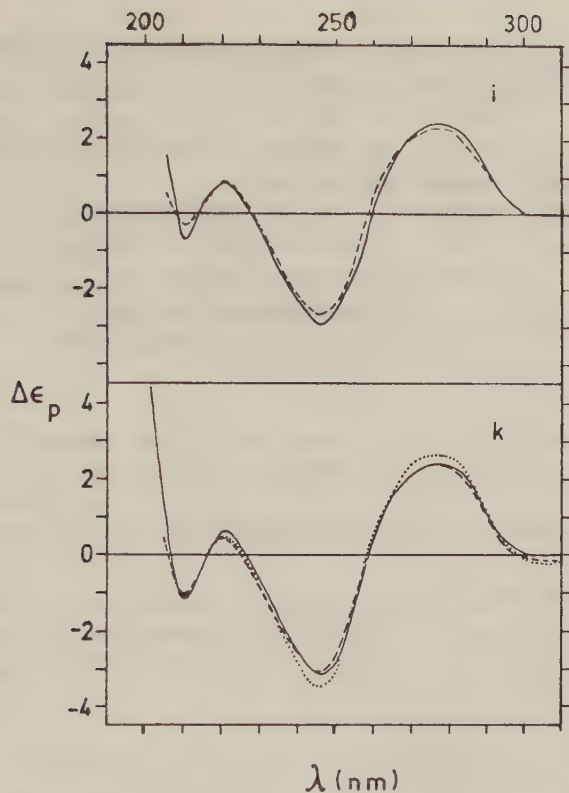


Abb. 11 C

CD-Spektren von DNA-Proben verschiedener Spezies in zwei verschiedenen Puffern

- | | |
|--------------------|-------------------------------|
| a) <i>S.lutea</i> | ----- = 0.15 M NaCl/Tris/EDTA |
| <i>lutea</i> | ———— = 10^{-3} M NaCl |
| b) <i>E.coli</i> | Symbole umgekehrt wie bei a) |
| c) <i>C.johns.</i> | Symbole wie bei a) |

- d) B.megat. - - - - = 0.1 M NaCl ., — = 10^{-3} M EDTA
e) B.subt. Symbole wie bei a)
f) T 7 Phage Symbole wie bei a)
g) Lachs Sperm - - - - = 0.1 M NaCl ., — = 10^{-3} M NaCl
h) Heringssperm Symbole wie bei g)
i) Kalbs Thymus Symbole wie bei a) (Worthington)
k) Kalbs Tyhmus — = 1 mM Tris, pH 7.4 (Worth .)
 = Worthington DNA in 10^{-2} M
 Phosphatpuffer pH 7.01
 - - - - = Sigma DNA im selben Puffer

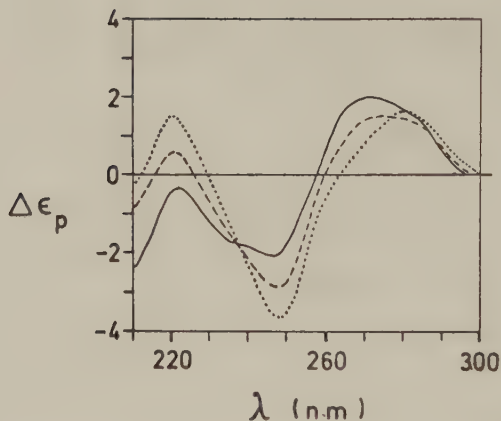


Abb. 12

CD-Spektren von *S.lutea* DNA (—————), *E.coli* DNA
(- - - - -) und *C.johnsonii* DNA (.....) in 1mM NaCl

Variationen der DNA-Spektren, die mit ihrer Herkunft korrelierbar waren, wurden in folgenden Form-Parametern der Spektren gefunden:

- Maximalintensitäten ($\Delta\epsilon^+$ und $\Delta\epsilon^-$) in den positiven und negativen Doublettbanden bei 275-280 nm resp. 245 - 250 nm und in der Bande bei 220 nm : $\Delta\epsilon_{220}$ (Abb. 13)
- Verhältnis der Maximalintensitäten: $\Delta\epsilon^+ / \Delta\epsilon^-$
- Verhältnis der Flächen unter den Banden (planimetriert):

$$R_{\text{def.}} = \lambda_0^- / \lambda_0^+ \int_+ \Delta\epsilon^+ d\lambda / \int_- \Delta\epsilon^- d\lambda$$

Die Flächen sind proportional zu den Rotatorstärken der Banden. (In guter Näherung: $1/\lambda$ durch $1/\lambda_0$ approximiert).

- Lage des positiven Maximums auf der Wellenlängenchse: λ_0^+
- Lage des Achsenschnittpunkts ("crossover") bei $(260 \pm 5)\text{nm}$.
- Gestalt der Banden : symmetrisch (Gaussform), asymmetrisch, Schultern bei 230, 270, 285 nm.

Alle diese Parameter zeigten eine Abhängigkeit vom GC-Gehalt. Die Korrelation ist am besten für $\Delta\epsilon(220)$ (Abb. 13), $\Delta\epsilon^+$, $\Delta\epsilon^-$ und $\int_+ \Delta\epsilon^+ d\lambda / \int_- \Delta\epsilon^- d\lambda$ in dieser Reihenfolge. (Abb. 14). Abb. 15 ist zum Vergleich der Arbeit von GRATZER et al, (1970) entnommen, die erschien, als unsere Messungen gerade abgeschlossen waren.

Keine hinreichend gute Korrelation zum GC-Gehalt fanden wir für folgende Parameter:

$$\Delta \stackrel{\text{def.}}{=} \int_- \Delta\epsilon^- d\lambda - \int_+ \Delta\epsilon^+ d\lambda$$

$$\Sigma \stackrel{\text{def.}}{=} \int_+ \Delta\epsilon^+ d\lambda + \int_- \Delta\epsilon^- d\lambda ,$$

$$\Delta / \Sigma , \quad \left| \frac{\int_- \Delta\epsilon^- d\lambda}{\Delta} \right| , \quad \left| \frac{\int_+ \Delta\epsilon^+ d\lambda}{\Delta} \right| ,$$

obwohl man eigentlich erwarten könnte, daß sich die Korrelation der Intensitäten $\Delta\epsilon_+$ und $\Delta\epsilon_-$ zum GC-Gehalt auch in diesen daraus abgeleiteten Größen niederschlagen sollte.

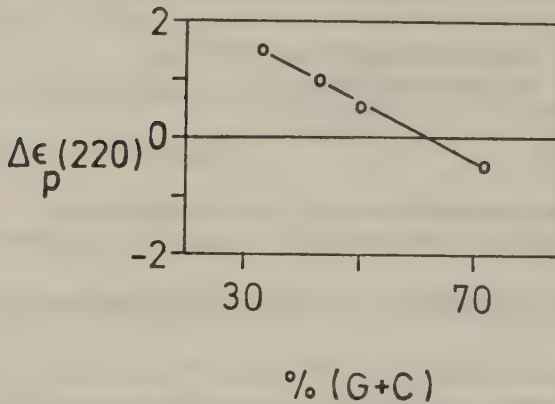


Abb. 13

CD-Intensität bei 220 nm für DNA von *C.johns.*, *B.subt.*, *E.coli* und *S.lutea* in 10^{-3} M NaCl.

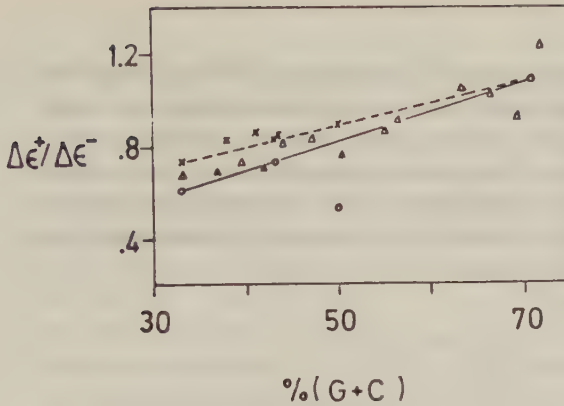


Abb. 14

Korrelation des Maximum-Minimum-Verhältnisses $\Delta\epsilon_o^+ / \Delta\epsilon_o^-$ zum GC-Gehalt für sieben verschiedene DNA-Spezies.

(o := vor Dialyse., x := nach Dialyse., Δ = Werte aus der Arbeit GRATZER et al, 1970)

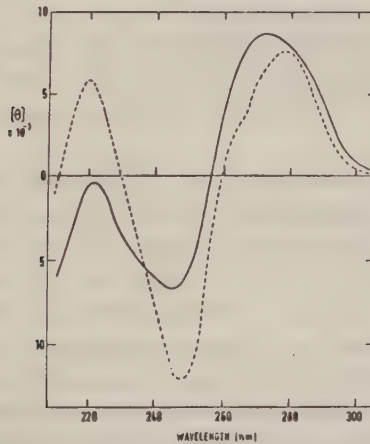


Fig.1. Circular dichroism of DNA species of widely different base composition. (—) *M. lyodeikicus* (28% A+T); (----) *Cytophaga* sp. (67.1% A+T)

Abb. 15

Zum Vergleich mit Abb. 12 (aus der Arbeit GRATZER et al, 1970)

GRATZER und Mitarbeiter zerlegen die CD-Spektren von (reellen) DNA-Proben in Linearkombinationen aus zwei (hypothetischen) Basisspektren: eines Spektrums für eine DNA-gleiche Polymerstruktur aus 100 % AT und eines analogen aus 100 % GC (Abb. 16). Mit dieser Zerlegung gelingt es ihnen, die tatsächlich gemessenen Spek-

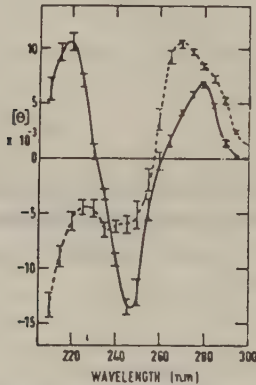


Fig. 3. Results of linear extrapolations, such as those of Fig. 2 to 0 and 100% (A + T). (---) 100% (G + C), (—) 100% (A + T). The error bars indicate the standard deviations of the intercepts used to derive the curves. The meaning of the curves is discussed in the text.

Abb. 16

Zerlegung nach GRATZER et al. (1970)

tren von 14 DNA-Proben aus Mikroorganismen mit über die ganze Skala von 33 % bis 72 % variierenden GC-Gehalten und von Heringssperm-DNA bis auf besser als 10 % genau analytisch darzustellen. Selbst wenn den extrapolierten

100 % GC und 100 % AT-Spektren keine direkte physikalische Realität entspricht, so hat diese Zerlegung doch einen unbestreitbaren Wert als ordnendes Prinzip für die Meßdaten. Aus diesen Extremspektren der GC-Skala lassen sich überdies einige "typische Merkmale für GC-reiche DNA-Spektren" herauslesen, die wir auch in den von uns gemessenen Spektren wiederfinden. Diese Merkmale sind: (Abb. 11, 12, 15, 16)

Für AT-reiche DNA

- positives Maximum nach 280 nm hin verschoben
- flach schräg abfallende Flanke vom positiven Maximum zum Achsenschnittpunkt hin
- schmale und symmetrische negative Bande von größerer Intensität als die positive Doublettbande
- ausgeprägte positive Bande bei 220 nm

Für GC-reiche DNA

- positives Maximum bei 270 nm
- Schulter bei 285 nm
- steiler Abfall vom pos. Maximum zum Achsenschnittpunkt hin
- neg. Bande zeigt Schulter bei 235 nm
- neg. Bande von geringerer Intensität als die pos. Doublettbande
- keine pos. Bande bei 220 nm

Im Abschnitt 3.1.3 wird diskutiert, inwieweit die Schultern und damit die Gestalt dieser Spektren den relativen Intensitäten der Elektronenübergänge in den verschiedenen DNAs und den Wechselwirkungen zwischen den Übergangsmomenten zugeordnet werden können.

3.1.2 CD-Spektren von Kalbsthymus DNA in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Metallionen

Es war bekannt, daß zur Bindung von Chromomycin-Antibiotika an DNA zweiwertige Metallionen erforderlich sind,

z. B. Mg^{2+} . Für die Bindung von Anthracyclinen oder Proflavinen und Ethidium Bromid an DNA dagegen werden keine Ionen gebraucht. Wenn wir aus CD-Spektren Aussagen über die Konformation der Chromomycin-Metall-DNA-Komplexe ableiten wollten, mußten wir gewissermaßen als Leerwert zunächst den Einfluß von Metallionen auf die Spektren der Antibiotika und der DNA allein untersuchen. Zudem war es wichtig, die DNA selbst als spektroskopisches Objekt in der Zirkulardichrographie genauer kennen zu lernen und ein Gefühl dafür zu entwickeln, wie sensibel sie auf äußere Einflüsse wie Pufferzusammensetzung, pH, Ionenmilieu reagiert. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Studie waren noch nicht viele DNA-CD-Spektren publiziert. Daher war es gerechtfertigt, zunächst katalogisierend vorzugehen. Diese Erfahrungen haben uns im späteren Verlauf der Untersuchungen mehrfach davor bewahrt, schlechtere DNA-Praeparate unbemerkt in Untersuchungsreihen zu benützen. Sie haben uns erlaubt, diese auszusortieren oder den Hinweis gegeben, durch welche Zusatzschritte die Praeparate behandelt werden mußten, um ihr Sollverhalten zu erreichen (etwa: Dialyse gegen EDTA).

Die CD-Spektren von Kalbsthymus-DNA in 10^{-3} M Tris-Puffer pH 7.4 in Gegenwart von sieben verschiedenen zweiwertigen Metallionen wurden vermessen: Co, Cu, Ca, Mn, Mg, Fe und Hg. In allen Proben war die DNA-Konzentration konstant 2×10^{-4} M DNA-P. Damit arbeiteten wir bei einer Absorption von $1.32 E_{260}$. Zur Berechnung molarer Konzentrationen an Nukleotiden wurde ein molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{260} = 6600$ zugrundegelegt (MAHLER-CORDES, 1967). Dies entspricht ziemlich genau der Überschlagsrechenregel: $1 E_{260} \hat{=} 50 \mu g \text{ DNA}$.

Die Gesamt-Metallionenkonzentrationen innerhalb der Probenreihen waren 4×10^{-4} M und 40×10^{-4} M, so daß mit zwei

bzw. zwanzigfachen Metallionen-Überschuß pro DNA-Phosphat-Rest gearbeitet wurde. Die Spektren sind angeführt in den Abbildungen 17 A, 17 B.

Folgende Aussagen sind möglich:

- 1.) Durch Hg^{2+} -Ionen wird das DNA-Spektrum stark verändert (17 B, h). Alle übrigen Me^{2+} -Ionen verändern die Gestalt des DNA-Spektrums in geringerem Maße. Gewisse Gemeinsamkeiten treten auf:
- 2.) Durch alle Ionen mit Ausnahme von Mg^{2+} wird die Intensität des positiven Maximums ($\Delta\epsilon^+$) herabgesetzt. Ein Buckel bei 280-285 nm bleibt als Maximum übrig, während die Dichroizität bei 270 nm abnimmt, so daß eine flach abfallende Flanke vom positiven Maximum zum Achsen-schnittpunkt hin auftritt, die wir auch bei DNA-Spektren mit hohen (A+T)-Gehalten beobachtet hatten.
- 3.) Durch alle Ionen mit Ausnahme des Cu^{2+} (Abb. 17B, g) werden Intensität und Form der negativen Bande nicht wesentlich geändert.
- 4.) Mit Ausnahme des Cu^{2+} ändern die Ionen auch nur unwesentlich die DNA Bande bei 220 nm. Für Cu^{2+} war hier die genaue Messung nicht möglich auf Grund des Absorptionsbeitrages der Cu^{2+} -Ionen in diesem Wellenlängenbereich.
- 5.) Für alle Ionen sind die spektralen Unterschiede zwischen niedrigem und hohem Konzentrationsverhältnis Ion:DNA nur gering. Die Unterschiede sind lediglich für Cu^{2+} etwas stärker ausgeprägt. Es zeigt sich aber auch hier nur eine graduelle Steigerung.
- 6.) Bei Hg^{2+} allein lassen sich keine Beziehungen erkennen zwischen den Spektraländerungen bei niedrigem und bei hohem Konzentrationsverhältnis $\text{Me}/\text{DNA-P}$. Bei der niedrigen Me -Ionen Konzentration sind die Effekte größer: die positiven Maxima bei 220 nm und 275 nm sind völlig verschwunden, und stattdessen hat das Spektrum nur zwei

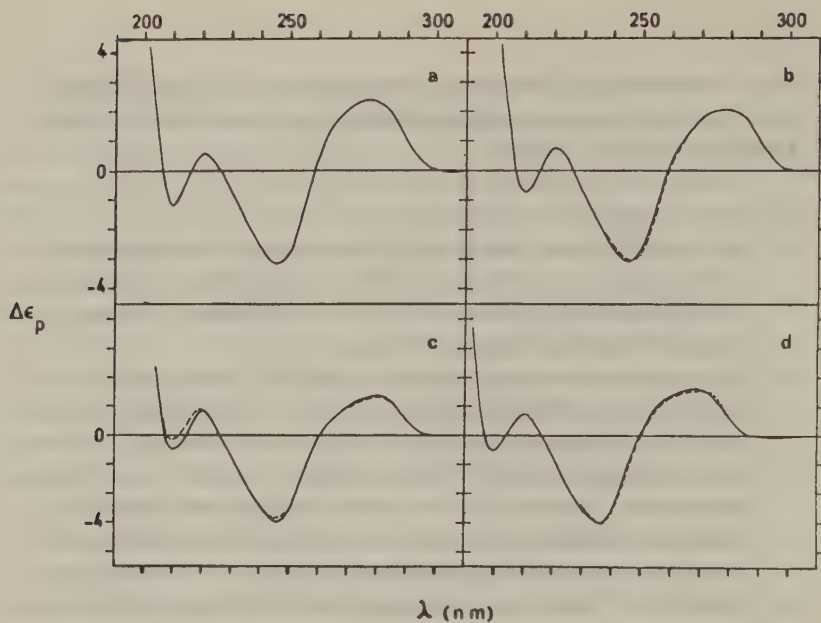


Abb. 17 A

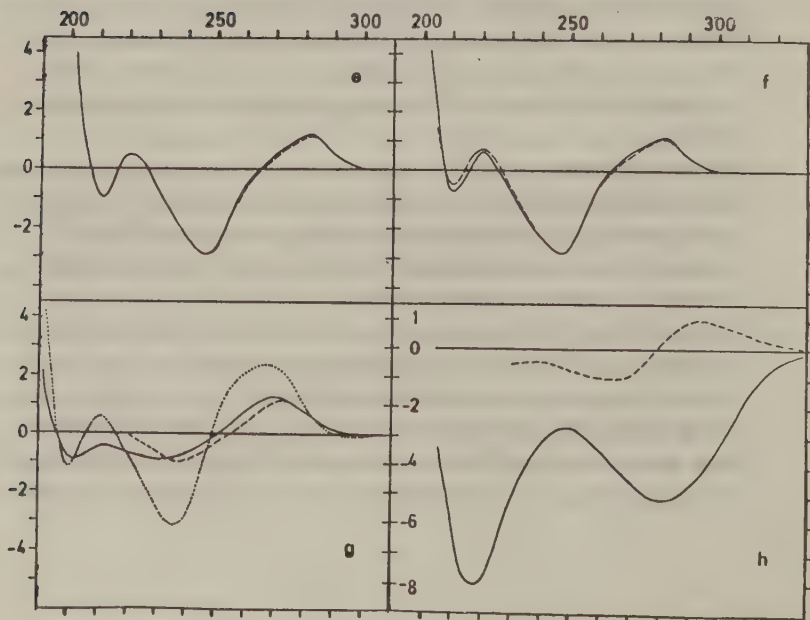


Abb. 17 B

Abb. 17

CD-Spektren von Kalbsthymus DNA in 10^{-3} M Tris Puffer pH 7.4 in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Metallionen:

- a) DNA allein in der Konzentration 2×10^{-4} M DNA-p ($E_{260}=1.32$).
- b) DNA + Mg^{2+} (————) 4×10^{-4} M., (-----) 40×10^{-4} M.,
- c) DNA + Mn^{2+} ., Symbole hier und bei den folgenden wie bei b)
- d) DNA + Ca^{2+} ., e) Co^{2+} ., f) Fe^{2+} ., g) Cu^{2+} ., h) Hg^{2+} .,

negative Banden sehr hoher Intensität. Es ist schwierig zu beurteilen, ob die beiden ursprünglichen positiven Banden ihr Vorzeichen umgekehrt und ihre Intensität geändert haben, oder woher sonst diese Banden stammen, deren Ausläufer sich bis recht weit ins langweilige Gebiet erstrecken (340 nm). In diesem Gebiet wird normalerweise keine Elektronen-Anregungsenergie für DNA gefunden.

Bei der hohen Hg^{2+} Ionenkonzentration nimmt das Spektrum wieder konservative Gestalt an und ähnelt einem in der Intensität auf die Hälfte reduzierten und um ca. 20 nm zum Langwelligen hin verschobenen DNA-Spektrum. Der Abstand der Maxima stimmt mit dem in DNA-Kontrollspektrum überein.

Eine Interpretation dieser Befunde ist schwierig, da wir keine Gelegenheit zu längeren systematischen Meßreihen hatten. Die Befunde stimmen jedoch überein mit denen von CHENG (1965), der in analogen ORD-Untersuchungen ebenfalls die größten Änderungen für Hg^{2+} - und Cu^{2+} - Ionen fand. Das Studium der Wechselwirkung von Metallionen mit Nucleotiden, Oligo- und Polynucleotiden beschäftigt intensiv

einen ganzen Forschungszweig. Es war daher nicht beabsichtigt, die Wechselwirkung von DNA mit Metallionen im Detail zu untersuchen. Unser Anliegen ist zu Eingang dieses Abschnittes erläutert worden. Wir wollten ermitteln, wie sensibel die CD-Spektren für Konformationsänderungen von DNA bei Komplexbildung mit kleinen Molekülen sein können. Nach diesen Messungen sieht es so aus, als ob sich die Konformationsänderungen am deutlichsten in der positiven Doublettbande des DNA-Spektrums niederschlagen, und daß hier Ähnlichkeiten in den Konformationen eines DNA-Me²⁺-Komplexes und einer AT-reichen DNA bestehen.

Für Hg²⁺ wird diskutiert, daß sich das Ion in einem ersten Bindungsmodus an die N₁O₆-Gruppierung der Guanosin-Base bindet und nicht an die Phosphatgruppe (EICHHORN und CLARK, 1963). Bei höheren Ionenkonzentrationen überwiegt der Einfluß eines zweiten Bindungsmodus, in dem noch ein beträchtlicher Grad an Ordnung in der Basenstapelung im Komplex erhalten ist (YAMANE und DAVIDSON, 1961). Dies stimmt mit unserer Beobachtung überein, daß bei 20xHg²⁺ wieder ein konservatives CD-Spektrum entsteht. Ein solches kommt auch bei nativer DNA nur durch die Wechselwirkung zwischen den Übergangsmomenten helical angeordneter Basenpaare und nicht durch inhärente optische Aktivität einzelner Bausteine des Makromoleküls (Basen, Zucker, Phosphate etc.) zustande.

Bemerkung

Bei unseren ersten Messungen von CD-Spektren der DNA-Proben verschiedener Herkunft, die wir in verschiedenen Puffersystemen ausführten, fanden wir in 10⁻³ M NaCl eine weniger gute Korrelation des Verhältnisses $\Delta\epsilon^+/\Delta\epsilon^-$ zum GC-Gehalt als in 0.15M NaCl, 0.01 M Tris. 0.001 M EDTA, pH 7.4. Die $\Delta\epsilon^+/\Delta\epsilon^-$ -Werte für die bakteriellen DNA-Proben fielen bei 10⁻³ M NaCl unter die später ermittelte

Gerade (Abb. 14). Die $\Delta\epsilon^+$ -Werte für diese DNA-Proben waren zu niedrig. Nach 48 h Dialyse gegen 10^{-3} M EDTA, 10^{-2} M Tris, 0.1 M NaCl und anschließender Dialyse gegen den gewünschten Meßpuffer war die vorher bemerkte Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers weitgehend verschwunden, und die $\Delta\epsilon_o^+/\Delta\epsilon_o^-$ -Werte der bakteriellen DNA-Proben lagen besser auf einer Geraden zusammen mit denen der anderen DNA-Proben. Daraus wurde geschlossen, daß die DNA-Präparation nach MARMUR (1961) ohne Dialyse nicht spektroskopisch hinreichend reine (Me-Ionen freie) DNA liefert, und daß für spektroskopische Untersuchungen extensive Dialyse gegen EDTA erforderlich ist.

Andererseits finden GRATZER et al. (1970), daß auch bei sorgfältigster Präparation die in Abb. 14 gezeigten Streuungen von einer linearen GC-Abhängigkeit und selbst von einer mit quadratischen Termen korrigierten GC-Abhängigkeit nicht beseitigt werden können und daß diese Streuung eine inhärente Eigenschaft der DNA-Proben ist. Die CD-Spektren von Polynukleotiden und Nukleinsäuren hängen sehr sensibel von der Art der "nearest neighbor - Wechselwirkungen" zwischen den Elektronenübergängen in benachbarten Basenpaaren ab. Die "nearest-neighbor"-Zusammensetzungen vieler DNA-Spezies sind aber weit von der statistisch willkürlichen Zusammensetzung entfernt. Die vollständige Beschreibung dieser "nearest-neighbor"-Wechselwirkungen in einem voll basengepaarten Polynukleotid aber erfordert mindestens 10 spektroskopische Parameter. Daher ist auch gar nicht zu erwarten, daß die Spektren mit zwei oder selbst drei Parametern in einem Computerfit streuungsfrei analysiert werden können. Beim derzeitigen Informationsstand ist es noch nicht möglich, aus den Abweichungen der Daten einzelner DNA-Spezies von einem linearen oder quadratischen Fit der spektralen Daten gegen den GC-Gehalt bereits Rückschlüsse über die Abweichung der Verteilung der Basenpaare in diesem DNA-Molekül von statistisch willkürlichen Mittel zu ziehen.

3.1.3 Heuristische Beschreibungsversuche

Man könnte den Erkenntnis-Prozeß in den empirischen Naturwissenschaften in vier Etappen unterteilen:

- a) Sammeln experimenteller Beobachtungen mit optimaler Meßgenauigkeit an möglichst gut definierten Objekten.
- b) Ordnen der Untersuchungsergebnisse nach heuristischen Prinzipien.
- c) Versuch, die heuristisch erfolgreichen Ordnungskriterien den Parametern eines theoretischen Modells zuzuordnen.
- d) Entscheidung unter mehreren möglichen Theorien zur Erklärung der bisherigen Befunde durch weitergehende Vorhersagen dieser Theorien und Entwurf neuer "Kruzial"-Experimente, deren Resultate nur noch mit den Vorhersagen einer dieser Theorien übereinstimmen. Diese Theorie wird beibehalten, die anderen verworfen.

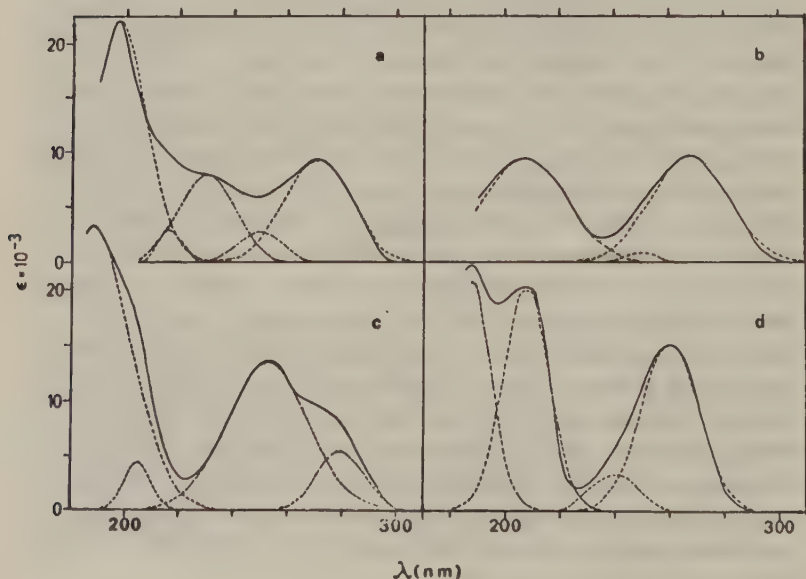


Abb. 18

Zerlegung der Nukleotid-Absorptionsspektren in Guassbanden

a = Cytidin b = Thymidin c = Guanosin d = Adenosin

In der Erforschung der Elektroneneigenschaften biologischer Makromoleküle lassen sich diese Stadien klar nachzeichnen. Im Unterschied zu anderen weiter fortgeschrittenen Forschungsgebieten finden wir uns hier noch weitgehend in den ersten beiden Abschnitten mit gelegentlichen Vorstößen in den dritten. Daher haben wir auch versucht, unsere verschiedenen DNA-CD-Spektren zunächst einmal nach heuristischen Kriterien zu ordnen. Ein solches Kriterium wurde von TINOCO, (1968) und von JOHNSON und TINOCO (1969) angegeben. Er fand, daß die CD-Spektren von Nukleinsäuren formal befriedigend beschrieben werden können in einem Zwei-Parameter-Fit durch Zerlegung nach den Basisfunktionen $f(\nu - \bar{\nu})$ und $\partial f / \partial \nu$ welche die Absorptionsspektren der Monomere der betreffenden Polynukleotide und deren erste Ableitungen nach der Frequenz ν darstellen. Die Koeffizienten der Zerlegung nach diesen beiden Basisfunktionen konnte er ferner als Maß für zwei verschiedene Typen von Wechselwirkungen der Übergangsdipolmomente der Basen im Polynucleotid identifizieren. Damit müßte es umgekehrt möglich sein, bei Durchführung dieses Fits an verschiedenen gemessenen DNA-CD-Spektren aus den erfolgreichen Fit-Parametern Aussagen über die relativen Größenordnungen dieser Wechselwirkungen in der entsprechenden DNA-Probe zu machen (Schritte c) und d) .)

In der Tat ist es möglich, die in Abb. 11 gezeigten CD-Spektren mit einem solchen Zwei-Parameter-Fit (noch besser mit einem Drei-Parameter-Fit unter Hinzunahme der zweiten Ableitungen $\partial^2 f / \partial \nu^2$) gut zu approximieren. Die Absorptionsspektren der Nukleotide (DE VOET et al., 1963) wurden zerlegt in eine Summe von Gaussbanden:

$$\epsilon_{\text{Monomer}}(\lambda) = \sum_k \epsilon_k^{\text{max}} \cdot \exp \left\{ -\frac{1}{2\sigma_k^2} (\lambda - \lambda_k^{\text{max}})^2 \right\}$$

$$\sigma_k = \delta_k / \sqrt{\ln 2}$$

$$\delta_k = \text{halbe Bandenbreite auf halber Höhe}$$

Die Charakteristika dieser Zerlegung sind in Tabelle III aufgeführt, die Zerlegung in Abb. 18. Aus dieser analytischen Darstellung der Absorptionsspektren wurden die gewichteten effektiven Monomerspektren für GC-Gehalte von 33 %, 43 %, 50 % und 72 % sowie deren erste und zweite Ableitungen ermittelt (Abb. 19, 20, 21).

Tabelle III

Charakteristika der Zerlegung der Nucleotid-Absorptionsspektren in eine Summe von Gaussbanden

Nucleot.	$\lambda_K^{\max} \text{ (nm)}$	$\epsilon_K^{\max} \text{ (cm}^2\text{)}$	$d_K \text{ (nm)}$
T	207.0	9 250	18.0
	249.5	750	7.0
	267.5	9 625	16.5
C	197.0	22 000	12.0
	216.5	2 750	5.5
	230.0	7 750	12.5
	250.0	2 625	9.5
	271.0	9 250	14.5
	188.0	25 750	16.5
G	205.0	4 375	5.75
	253.0	13 500	17.25
	280.0	5 250	10.0
	187.5	20 750	8.5
A	207.0	20 250	9.5
	240.0	3 250	10.5
	260.0	15 000	12.5

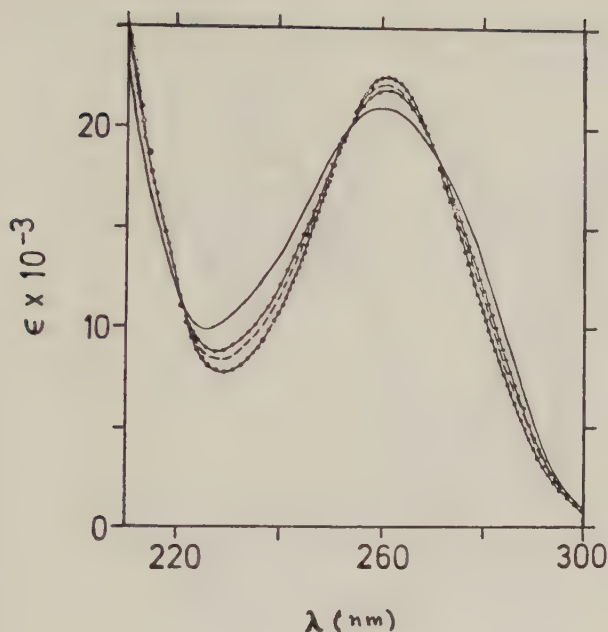


Abb. 19

Aus der Zerlegung nach Tabelle III zurückberechnete Effektive Monomer-Absorptionsspektren für GC = 33 % (-o-o-o-); 43 % (-----); 50 % (-●-●-●-) und 72 % (———). Die Ordinatenwerte sind um einen Faktor 2 zu groß. Die exakten Intensitäten wurden später noch einmal neu berechnet und werden im Anhang gegeben. Der Verlauf der Kurven ist jedoch korrekt und zeigt, daß mit der Zerlegung dem tatsächlichen Verlauf sehr nahe kommende Absorptionsspektren erzeugt werden. Bei 280 nm liegt eine Schulter, die sich in den Ableitungen bemerkbar macht.

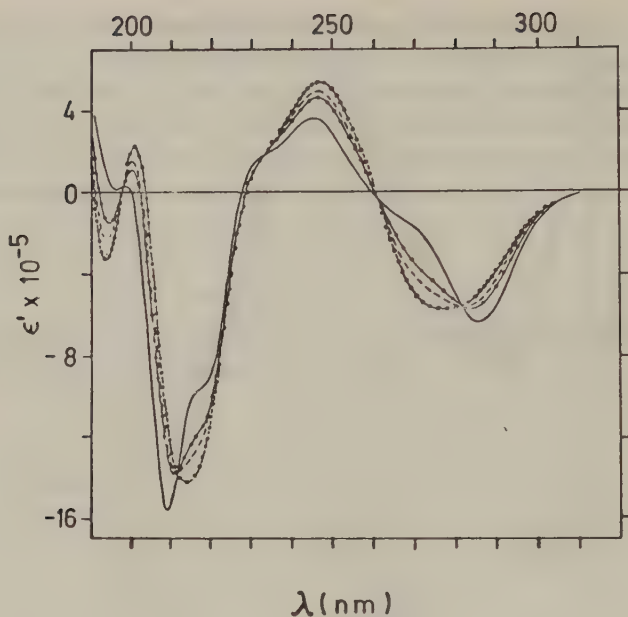


Abb. 20

Erste Ableitungen der effektiven Monomerspektren aus Abb. 19.
(Symbole wie dort.)

Die Linearkoeffizienten a, b und c der Approximation:

$$\Delta \epsilon (\lambda_i) = a \cdot \epsilon (\lambda_i) + b \frac{\partial}{\partial \lambda} \epsilon (\lambda_i) + c \frac{\partial^2}{\partial \lambda^2} \epsilon (\lambda_i) \quad (*)$$

erhält man durch die Lösung eines Systems von drei linearen Gleichungen in den drei Unbekannten a, b und c. Dabei gilt je eine Gleichung vom Typ (*) an je einer der

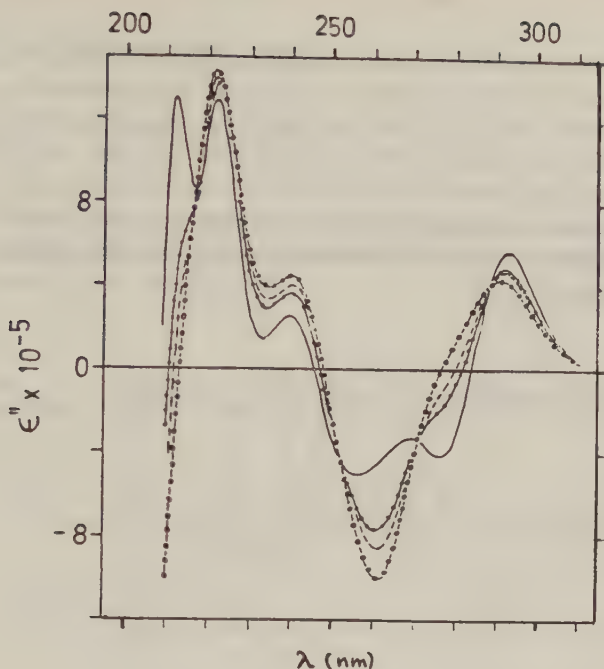


Abb. 21

Zweite Ableitungen der effektiven Monomer-Spektren aus Abb. 19 (Symbole wie dort.)

drei Wellenlängen λ_1, λ_2 und λ_3 , an denen das gemessene und das berechnete Spektrum übereinstimmen sollen. Als solche Wellenlängen wurden meist gewählt (λ_0^+ , λ_0^- und $\lambda_{\text{crossover}}$), aber gelegentlich auch andere λ -Triplets.

$$\Delta\epsilon(\lambda_0^+) = a \epsilon(\lambda_0^+) + b \epsilon'(\lambda_0^+) + c \epsilon''(\lambda_0^+)$$

$$\Delta\epsilon(\lambda_0^-) = a \epsilon(\lambda_0^-) + b \epsilon'(\lambda_0^-) + c \epsilon''(\lambda_0^-)$$

$$\Delta\epsilon(\lambda_{\text{crossover}}) = a \epsilon(\lambda_{\text{cross}}) + b \epsilon'(\lambda_{\text{cross}}) + c \epsilon''(\lambda_{\text{cross}})$$

Dieses Gleichungssystem läßt sich leicht nach der Determinantenmethode lösen, da die Koeffizientendeterminante nicht verschwindet.

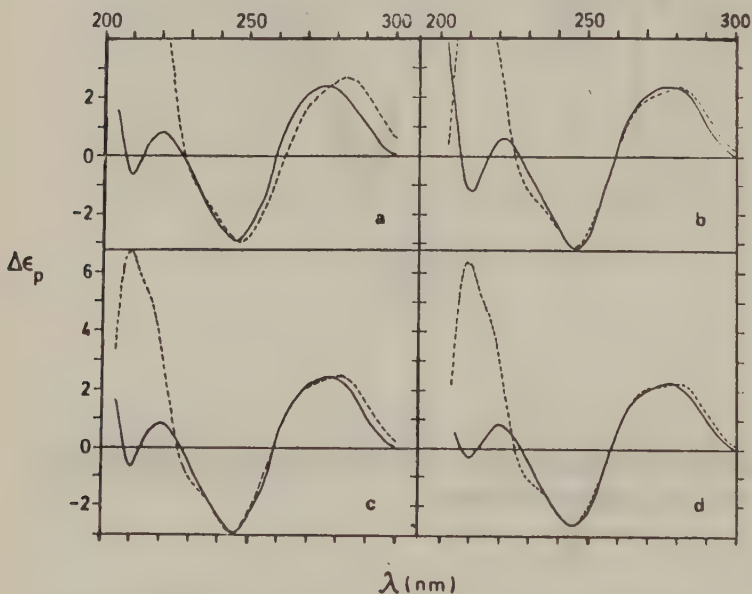


Abb. 22 A

Tinoco Fit für diverse DNA-Proben (Legende: siehe Abb. 22 B).

In einem ALGOL-Programm wurden dann die aus der Determinantenmethode erhaltenen Linearkoeffizienten a , b und c in vorgegebenen Intervallen in kleinen Schritten variiert und die zugehörigen $\Delta\epsilon$ -Spektren nach Gleichung (*) berechnet und ausgedruckt. Rechenanlage CD 3300 des Universitätsrechenzentrums. (Programme im Anhang). Die besten so erhaltenen Spektral-Approximationen sind in Abb. 22 wiedergegeben.

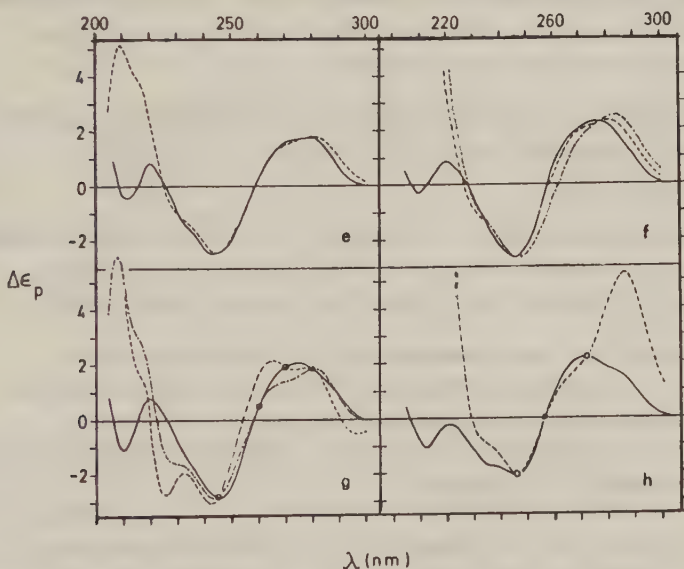


Abb. 22 B

Tinoco Fit für diverse DNA-Proben

- a) Kalbsthymus DNA — gemessenes Spektrum in 10^{-3} M NaCl
 ---- berechnetes Spektrum mit erster Ableitung allein

($c_3 = 0$) so daß $\Delta\epsilon_{273}/\Delta\epsilon_{246}$ mit dem gemessenen Wert übereinstimmt.

- b) Kalbs Thymus DNA — gemessenes Spektrum in 10^{-3} M Tris pH 7.4 — Fit mit erster und zweiter Ableitung ($c_3 \neq 0$)
- c) Kalbs Thymus DNA — gemessen in 10^{-3} M NaCl — berechnet für 43 % (6 + C) mit $a_1 = -0.0192$; $b_2 = -0.4903$; $c_3 = -0.104$;
- d) Kalbs Thymus DNA — gemessen in 0.15 M NaCl/Tris/EDTA — berechnet für 43 % (6 + C) und $a_1 = -0.0134$; $b_2 = -0.4424$; $c_3 = -0.123$;
- e) B.subt. W 23 DNA — gemessen in 0.15 M NaCl/Tris/EDTA — berechnet mit $a_1 = -0.0243$; $b_2 = -0.3819$; $c_3 = -0.095$
- f) Kalbs Thymus DNA — gemessen in 0.15 M NaCl/Tris/EDTA — berechnet nur mit erster Ableitung, ($c_3 = 0$); — berechnet mit erster und zweiter Ableitung ($c_3 \neq 0$);
- g) E.coli DNA — gemessen in 0.15 M NaCl/Tris/EDTA — berechnet um bei 245, 270 und 280 nm mit dem gemessenen Spektrum Übereinstimmung zu erreichen; — berechnet, um bei 245, 260 und 280 nm Übereinstimmung zu erreichen;
- h) S.lutea DNA — gemessen in 0.15 M NaCl/Tris/EDTA — berechnet um bei 245 nm, im Achsenschnittpunkt und im positiven Maximum Übereinstimmung mit dem gemessenen Spektrum zu erreichen. Spektral-Fits, bei denen Wert auf Übereinstimmung an einem anderen Wellenlängentriplett gelegt wurde, wurden ebenfalls durchgeführt. Die Übereinstimmung der berechneten mit dem gemessenen Spektrum war dann nicht besser als in den hier abgebildeten Fällen.

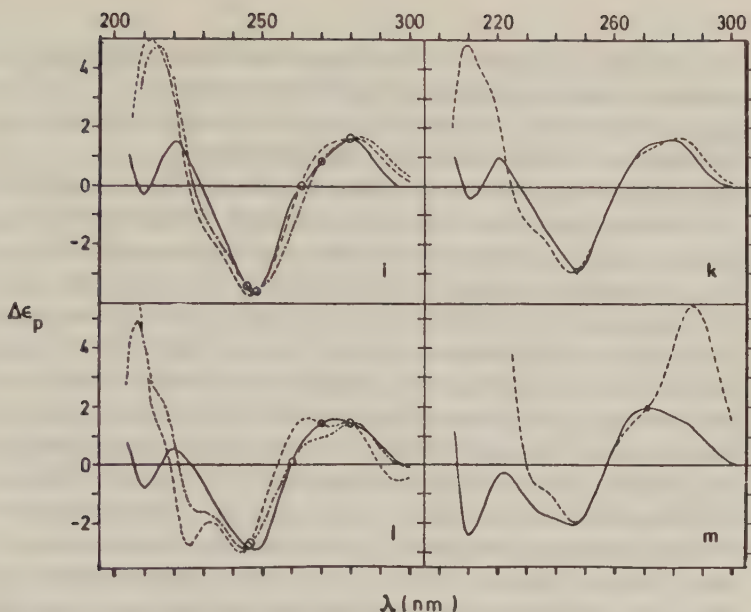


Abb. 22 C

Tinoco-Fit für Cyt.johns. DNA (i) in 1mM NaCl, B.subt. DNA (k), E.coli DNA (l) und S.lutea DNA (m) in 1 mM NaCl. (—) gemessenes CD-Spektrum. (---) und (-.-.-.-) berechnete Spektren. An den durch --O-- bezeichneten Wellenlängen wurde Übereinstimmung vorgeschrieben.

Das Resultat aus diesen heuristischen Versuchen, das Beobachtungsmaterial zu ordnen, läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

o.) Prinzipiell lassen sich auf die von TINOCO beschriebene Weise gute Approximationen gewinnen.

- 1.) Mit dem Drei-Paramterfit sind bessere Approximationen zu erreichen als mit dem Zwei-Paramter-Fit.
- 2.) Die Approximation ist um so besser, je niedriger der G+C-Gehalt der zu analysierenden DNA-Spezies.
- 3.) Die Lage der Schultern bei 235 und 285 nm (siehe Spektren von *S.lutea* DNA, Abb. 22 C m) läßt sich erstaunlich gut durch dieses Approximationsverfahren erklären. Die Intensität dieser Schultern jedoch nicht so gut, besonders nicht bei Spektren GC-reicher DNA-Spezies.
- 4.) Die Gestalt der Spektren - vor allem die charakteristische flache zum Achsenschnittpunkt abfallende Flanke in Spektren GC-reicher DNAs wird gut approximiert. Die Approximation der Doublettbanden für *B.subt.*-DNA und *Kalbethymus* DNA (mittlere GC-Gehalte) ist fast perfekt.
- 5.) Die 220 nm Bande wird in keinem einzigen Approximationsversuch auch nur annähernd richtig wiedergegeben. Daraus muß geschlossen werden, daß diese Approximierbarkeit nach Gleichung (*) nur für die Doublettbande des DNA-CD-Spektrums gilt. Eine gute Approximation auch im kurzwelligen Teil des Spektrums kann allenfalls erreicht werden bei Verwendung separater Liniearkoeffizienten für die kurzwellige Absorptions-Bande der DNA.
- 6.) In eine gute Approximation geht am stärksten die erste Ableitung der 260 nm - Absorptionsbande ein, da diese bereits die Gestalt einer konservativen Doublettbande besitzt: $|b| > |a|, |c|, b < 0$. Erstaunlich ist aber, daß man für eine gute Approximation die zweite Ableitung stärker heranziehen muß, als die Stammfunktion: $|c| \sim |b|/4$,
 $|a| \sim |b|/10$, $c, a < 0$,

BRAHMS (1970) machte darauf aufmerksam, daß die beobachtete schlechtere Approximation für DNA-Spezies hoher GC-Gehalte darauf zurückzuführen ist, daß speziell der Beitrag der Guanin-Reste zum CD-Spektrum einer DNA besonders empfindlich

auf Umgebungseinflüsse reagiert. Zum Beispiel wird für poly dG ein konservatives CD-Spektrum mit umgekehrter Vorzeichenfolge wie bei DNA gefunden, für poly r (GC) dagegen ein konservatives CD-Spektrum mit der gleichen Vorzeichenfolge wie für native DNA. Der Grund für diese Vorzeichenumkehr der Banden ist in den starken Unterschieden der Art der Wechselwirkungen zwischen den Elektronenübergangsmomenten in gestapelten G-Resten in einem helicalen Einstrang-Homopolymer und in einem helicalen Zweistrang-Heteropolymer zu suchen. Ähnliche Beobachtungen über die Empfindlichkeit von G-Resten gegenüber Milieueinflüssen bei doppelsträngiger DNA Konfiguration wurden von COURTOIS, FROMAGEOT und GUSCHLBAUER, (1968) gemacht. Bei der Titration von DNA bis zum stark sauren Milieu ($\text{pH} \lesssim 1$) beobachteten diese Autoren einen Konformationsübergang im ORD-Spektrum der DNA (Vorzeichenumkehr einer Bande) am pK der Protonierung des N7 der Guanosin-Base. Dieser Übergang wurde interpretiert als das Umklappen des Guanosins aus der anti- in die syn- Konfiguration und damit als der Übergang des betreffenden Basenpaares aus der Watson-Crick in die Hoogsteen-Konfiguration (COURTOIS, FROMAGEOT und GUSCHLBAUER, 1968). Das Guanosin scheint von allen Basen innerhalb der DNA-Konformation die größte Freiheit zu haben, auf Milieu-Einflüsse sensibel zu reagieren. Dies wird im CD- oder ORD-Spektrum erkennbar. Andererseits finden wir für Guanosin und Cytidin in den Absorptionsspektren der Monomeren die längstwelligen Banden. (Abb. 18) Dieser Umstand macht sich in der langwelligen Flanke der berechneten effektiven Monomerspektren bei hohem GC-Gehalt durch eine Schulter bei ca. 280 nm bemerkbar. (Abb. 19 ...). Diese Schulter wird tatsächlich in den Absorptionsspektren von DNA-Spezies hohen GC-Gehaltes beobachtet. Aus ihr resultiert in der ersten Ableitung ein zum noch längerwelligen hin gelegener Gipfel (Abb. 20), der sich in den errechneten approximativen CD-Spektren stark niederschlägt. Die erste

Ableitung geht am stärksten in die Approximation ein. Damit ist es einsichtig, warum die Lage der Schulter bei 285 nm in DNA-Spektren GC-reicher Spezies mit diesem Approximationsverfahren so gut erklärt werden kann. Da aber auch in den CD-Spektren GC-armer DNA Spezies an dieser Stelle ein Maximum liegt und andererseits in den GC-reichen Spektren die Intensität der Schultern nicht gut approximiert wird, ist es ungeklärt, ob dieser Erklärungsvorschlag physikalisch der richtige ist. Man könnte versucht sein, in Analogie zu den Absorptionsspektren dieses Zurückbleiben der Intensität in den tatsächlichen DNA-Spektren gegenüber der berechneten Intensitäten aus der Summe der Monomere als eine "Hypo-Dichroizität" anzusprechen. Jedoch bringt diese neue Begriffschöpfung keine weiteren Einsichten in die Natur des Sachverhalts. Die Hypo-Chromizität der DNA ist nämlich ein Effekt der Wechselwirkung der Übergangsmomente über lange Distanzen im DNA Molekül. Sie hängt nicht sehr sensibel ab von einer Änderung in der statistischen Verteilung der nächst benachbarten Basen in Stapelrichtung (nearest neighbor - Analyse). Für den Zirkulardichroismus der DNA dagegen trifft genau das Umgekehrte zu.

Eine andere Erklärung für die physikalische Natur der 285 nm-Schultern und Maxima, die in den Spektren freier und Metall-Ionen-komplexierter DNA auftreten, wird von VELLUZ, LEGRAND und GROSJEAN (1965) angeführt: Diese Autoren halten es für möglich, daß ein $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang in der DNA-Helixkonformation teilweise erlaubt wird und für die optische Aktivität am langwelligen Ende der UV-Banden verantwortlich ist. Der Vorschlag ist bisher noch nicht durch Versuchsmaterial zu belegen. Er geht über TINOCO's Theorie hinaus, welche in Übereinstimmung mit den MO (molecular orbital) Berechnungen von BERTHOLD et al. (1967) die Absorption und den

Zirkulardichroismus von DNA im nahen UV nur durch $\pi \rightarrow \pi$ Übergänge beschreibt.

Aufgrund der Größenverhältnisse der zu guten Approximationen erforderlichen Linearkoeffizienten ist vor einer Überbewertung des Erfolgs dieser Berechnungen zu warnen. Während nach TINOCO's theoretischen Überlegungen die Hinzunahme der zweiten Ableitung nur noch eine Korrektur höherer Ordnung sein sollte (Beiträge ca. 1%) und noch höhere Ableitungen ganz zu vernachlässigen sein sollen, finden wir einen Beitrag von ca. 20 % für die zweite Ableitung ($|c| \approx |c_1/4|$). Diese Beobachtung zieht sofort die Frage nach der physikalischen Bedeutung dieser Linearkoeffizienten nach sich. Zur Diskussion der Resultate unserer Bindungsstudien von DNA und Ethidium Bromid wird ein vollständiger Kalkül nach TINOCO's Theorie durchgeführt. Dabei werde ich auf diese Frage noch einmal eingehen. Hier soll nur abschließend festgestellt werden, daß mit dieser Theorie gute Approximationen erreicht werden können, die sogar die Lage einiger Schultern in den Spektren korrekt wiedergeben.

3.2 CD-Spektren von DNA-Komplexen mit Chromoglykosid-Antibiotika und zweiwertigen Metallionen

Die CD-Spektren der Komplexe von DNA mit Mithramycin und Chromomycin wurden im sichtbaren Spektralbereich, im "nahen" und im "fernen" UV-Bereich gemessen. Die Messungen im sichtbaren und nahen UV-Bereich wurden mit vier bakteriellen DNA-Spezies verschiedener (G+C) Gehalte ausgeführt. Es sollte geprüft werden, ob sich in den CD-Spektren die mit anderen physikalisch-chemischen Methoden gefundene praeferentielle Bindung dieser Antibiotika an GC-reiche DNA ebenfalls manifestiert. Bei den Messungen in

fernen UV sollte im Vergleich zu anderen Antibiotika: Daunomycin, Nogalamycin, Ethidium-Bromid und Aminoacridinen, untersucht werden, ob sich für Chromomycin und Mithramycin aus den Spektraländerungen im fernen UV-Bereich Hinweise auf den Bindungsmodus entnehmen lassen. Da KERSTEN et al. 1966 und WARING, 1970 für die Chromomycin-Antibiotika keine Intercalation gefunden hatten, erwarteten wir hier charakteristische Unterschiede in den CD-Spektren der Antibiotika - DNA Komplexe gegenüber den Komplexen der gewählten Vergleichssubstanzen. Die Untersuchungen im fernen UV-Bereich wurden in gemeinsamer Arbeit mit Dr. D.G. Dalgleish, Nuffield Department of Clinical Biochemistry, Universität Oxford, England durchgeführt.

3.2.1 Bindungsstudien mit Chromomycin und Mithramycin im Sichtbaren und im nahen UV Bereich (600 - 300 nm)

3.2.1.1 Absorptionsspektren und CD-Spektren

Die Absorptionsspektren von Chromomycin und Mithramycin sind in Abb. 23 a angegeben. Die Spektren der beiden Substanzen zeigen große Ähnlichkeit, da beide gleiche Chromophore haben und sich nur in den Zuckerseitenketten unterscheiden (Siehe Abb. 1). Die für die Untersuchungen im Sichtbaren herangezogene Bande hat ihr Maximum bei 405 nm mit ϵ -Werten der Größenordnung 10^4 cm^2 . Spektrophotometrische Untersuchungen der Komplexbindung dieser Antibiotika mit DNA und Mg^{2+} -Ionen anhand der Änderungen dieser Absorptionsbande sind beschrieben worden von WARD et. al., (1965), HARTMANN und Mitarbeitern, 1965, HAYASAKA und INOUE, 1969 und ERFMANN, 1963. Für die zirkulardichrographischen Untersuchungen wählten wir Antibiotikakonzentrationen von $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, da die CD-Messungen am genauesten

sind für Absorptionen von der Größenordnung einer Extinktionseinheit.

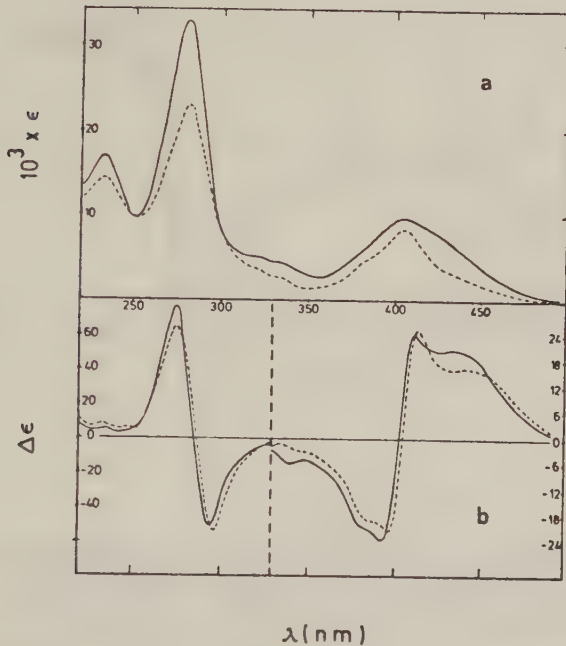


Abb. 23

Absorption (a) und Zirkulardichroismus (b) von freiem Mithramycin (—) und Chromomycin (----) in 1/15 M Phosphatpuffer pH 7.0 nach Sørensen bei 20°C.
 MW (Chromomycin) = 1183 d., MW (Mithramycin) = 1085 d.
 Antibiotikakonzentration 1×10^{-4} M, um im Bereich um 400 nm Extinktion 1.0 in den Proben zu erreichen für optimale Messgenauigkeit im Dichrographen.

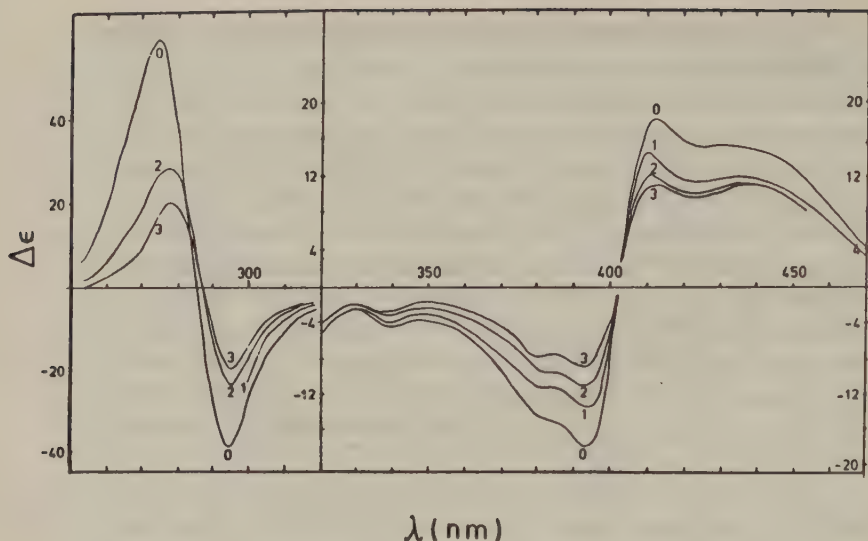


Abb. 24

0.1 mM Mithramycin in Störens Puffer (Exp. Einzelheiten s. Abb. 23). Veränderung des CD-Spektrums durch Mg^{2+} Ionen. Molaritätsverhältnisse Mithra.: Mg^{2+} : o) 1:0., 1) 1 : 4., 2) 1 : 20., 3) 1 : 40., Halblogarithmische Darstellung der Amplitudenänderung in Abb. 25.

Abb. 23 b zeigt die CD-Spektren von freiem Chromomycin und Mithramycin. Bei 405 nm finden wir ein Doublett mit fast exakt symmetrischen Banden in deren Flanken noch jeweils eine Bande sichtbar ist, bei 380 nm resp. bei 440 nm. Bei 290 nm finden wir ein weiteres Doublett das genau wie das

andere an der Stelle einer Absorptionsbande des Antibiotikums liegt.

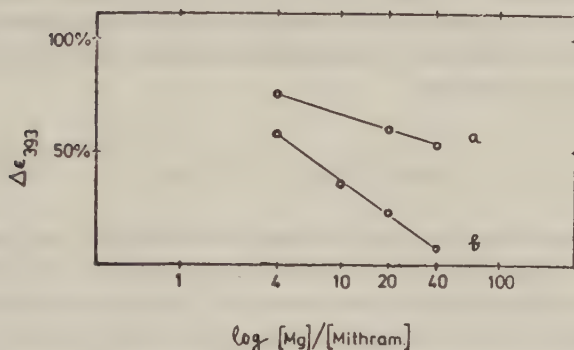


Abb. 25

Abnahme der CD-Doublettamplitude von Mithramycin durch Mg^{2+} -Ionen. a) in Abwesenheit b) in Anwesenheit einer konstanten Konzentration an DNA. (vgl. Abb. 24 und 29).

3.2.1.2 Einfluß von Mg^{2+} -Ionen allein

In der in Abb. 24 zusammengestellten Meßreihe wurde untersucht, wie Mg^{2+} -Ionen das CD-Spektrum von freiem Mithramycin verändern. Diese Voruntersuchung war nötig, da später die CD-Spektren der Drei-Komponenten-Komplexe Antibiotikum:Mg:DNA analysiert werden sollten. Befund: die Zu-

gabe von vierfachen, zwanzig- und vierzigfachen Konzentrationen an Mg^{2+} bezogen auf die molare Antibiotika-Konzentration reduzieren die Intensitäten der Doubletten progressiv, aber nicht linear, sondern exakt exponentiell abfallend. In einer halblogarithmischen Darstellung (Abb. 25 a) liegen für die drei Proben mit Mg^{2+} die Amplituden $\Delta\epsilon_{395}$ aufgetragen gegen $\log Mg^{2+}$ exakt auf einer Geraden:

$$\Delta\epsilon_{395} = a - b \times \log \left(\frac{[Mg^{2+}]}{[Mikrom.]} \right)$$

Numerisch beträgt die Amplitudenabnahme bei vierfachem molaren Konzentrationsverhältnis Mg^{2+} : Antibiotikum 25 %, bezogen auf die Amplitude des freien Antibiotika-Spektrums. Bei vierzigfachem Verhältnis ist die relative Amplitudenabnahme ≤ 50 %. Qualitativ ist das CD-Spektrum des freien Antibiotikums durch die Gegenwart des Metallions nicht wesentlich verändert worden - die Lage und die relativen Intensitäten aller Banden zueinander sind erhalten geblieben - lediglich quantitativ sind die Spektren gestaucht worden.

3.2.1.3 Einfluß von DNA allein

Als weitere Voruntersuchung wurden die CD-Spektren von Chromomycin mit 6-, 12-, 18- und 24fachem DNA P-Überschuß im Verhältnis zur molaren Konzentration des Antibiotikums in Abwesenheit von Mg^{2+} gemessen. (Wir definieren die Größe P/D als das molare Konzentrationsverhältnis DNA-P/Droge). Die Messung wurde vorgenommen eine halbe Stunde nach Zugabe der Komponenten. Die CD-Spektren mit und ohne DNA

waren fast identisch: (Abb. 26 a). Für Mithramycin wurden bei einem P:D Verhältnis von 24:1 geringfügig stärkere Amplitudenveränderungen als für Chromomycin gefunden :

~ 10 % Abnahme im langwelligen Doublett und ~ 25 % Abnahme im kurzwelligen Doublett (Abb. 26 b). Es fällt auf, daß das CD-Spektrum von Mithramycin eine kleine Bande bei 340 nm zeigt, welche bereits im CD-Spektrum des freien

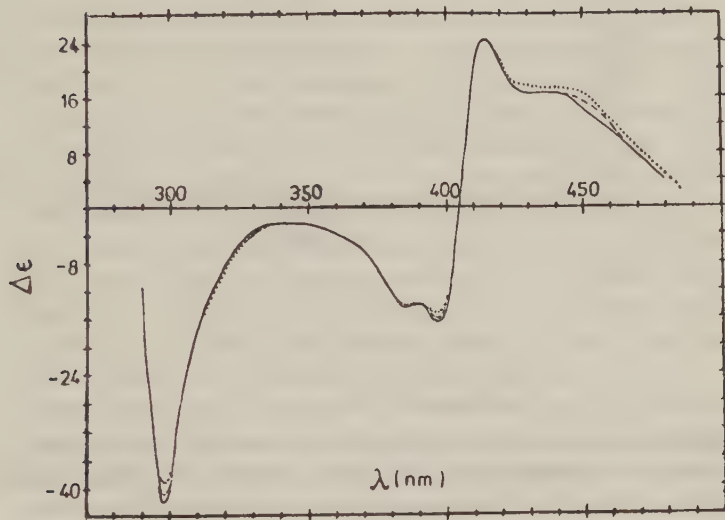


Abb. 26 a)

Chromomycin und DNA in Abwesenheit von Mg^{2+} . Molare Konzentrationsverhältnisse DNA - P : Chromo. = 6:1 und 12:1 (——— , kongruente Kurven) ., 18:1 (-----) und 24:1 (.....).

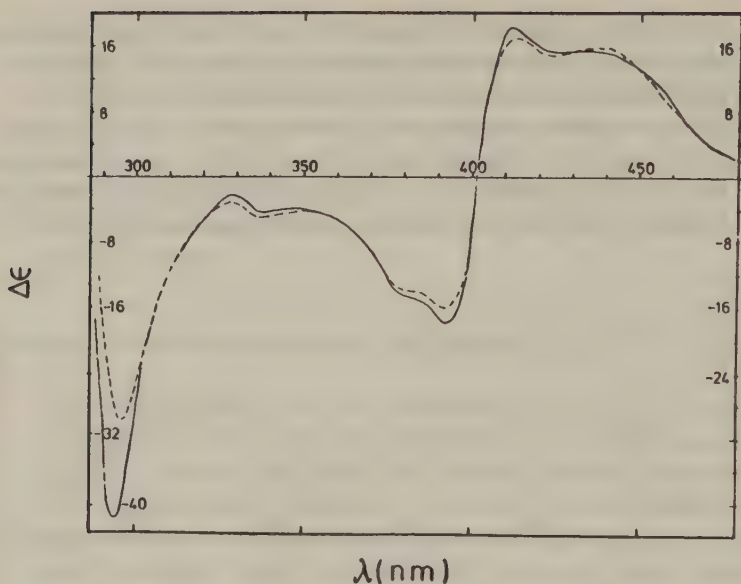


Abb. 26 b)

Mithramycin und DNA in Abwesenheit von Mg^{2+} , 0.1 mM Mithram. in Sörensen-Puffer (siehe Abb. 23). Molaritätsverhältnis DNA-P : Mithramycin 24 : 1 (-----), 0 : 1 (—————), d. h. freies Mithramycin.

Antibiotikums zu sehen ist, und die für Chromomycin nur sehr schwach angedeutet ist.

3.2.1.4 Komplexe DNA-Mg²⁺ - Antibiotikum

Die in Abb. 27 zusammengestellten Resultate zeigen, daß in Mithramycinlösungen in Gegenwart von DNA und Mg²⁺-Ionen ein Mithramycin-Mg²⁺-DNA-Komplex gebildet wird. Hier wurde die Mg²⁺-Konzentration konstant auf den doppelten Wert der molaren Konzentration des Antibiotikums gehalten und nur die Konzentration der zugegebenen DNA geändert. In diesem Experiment lassen sich qualitative Änderungen des Spektrums erkennen im Unterschied zu den bisher beschriebenen nur quantitativen Änderungen beim Zusammengeben von nur zwei der drei Komponenten. Die Doublettamplituden sowohl des langwellig gelegenen als auch des UV-Doubletts nehmen in diesem Experiment nahezu linear mit steigendem P/D-Verhältnis ab (siehe eingeschobenes Diagramm in Abb. 27). Die Bande bei 445 nm bildet sich sehr stark heraus. Diese fast lineare Abhängigkeit der Amplitude im 3-Komponentensystem im Gegensatz zur vorher geschilderten exponentiellen Abnahme im 2-Komponentensystem (Mg²⁺-Mithramycin) zeigt, daß es sich um zwei verschiedene Typen von Komplexen mit unterschiedlicher Stöchiometrie handelt. Die Stöchiometrie wurde nicht exakt numerisch ausgewertet, da hierzu die vorherige Kenntnis der Bindungisothermen von Mg²⁺-Ionen an das Antibiotikum und für die Einlagerung in den Komplex erforderlich gewesen wäre. Auf die Aufnahme der Bindungisothermen wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet, da frühere Erfahrungen der Arbeitsgruppe (W. Kersten, persönl. Mitteilung) gezeigt haben, daß diese Messung mit erheblichen experimentellen Schwierigkeiten verbunden ist.

Bei der Komplexbildung verschiebt sich die schwache Mithramycin-Bande von 340 nm nach 333 nm. Ihre Lage und ihre Intensität sind nicht mehr Funktion einer Variation des P/D-Verhältnisses - sie bleiben konstant solange Komplexbildung vorliegt. Im Absorptionsspektrum gibt es zwei

entsprechende Banden bei 315 nm und 340 nm, deren Intensität sich bei Komplexbildung mit DNA ändert und die zum Studium der Komplexbildung bereits herangezogen worden sind (ERFMANN, 1970). Die Änderungen im CD-Spektrum verlaufen insgesamt analog zu den spektralen Änderungen der Absorptionsspektren bei Komplexbildung mit DNA und Mg^{2+} , wie dies in Abb. 28 für Mithramycin im sichtbaren Spektralbereich veranschaulicht ist. Auch in den Absorptions-Spektren bildet sich ein neues Maximum bei 445 nm heraus und die Bande bei 405 nm wird abgebaut. Für Chromomycin erhielten wir analoge Ergebnisse wie die hier für Mithramycin beschriebenen. Sie werden daher hier nicht eigens gezeigt.

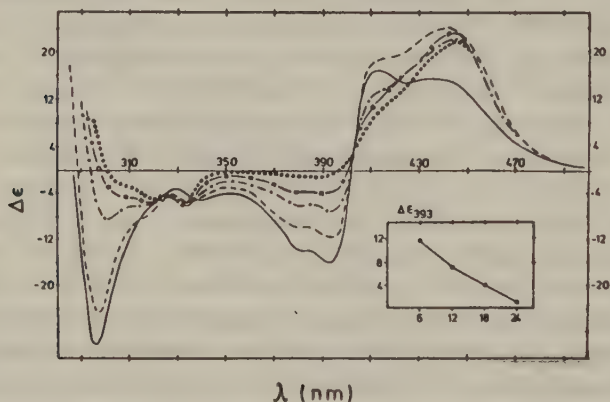


Abb. 27

Mithramycin- Mg^{2+} -DNA Komplex. Amplitudenvariation nach Variation der DNA-Konzentration bei festen Mithramycin und Mg^{2+} -Konzentrationen. Molaritätsverhältnisse Mithra: $Mg : DNA-P = 1:0:24$ (—), $1:2:6$ (-----), $1:2:12$ (-.-.-), $1:2:18$ (- - -), $1:2:24$ (.....). Mithramycin-Konzentration überall 0.1 mM. Eingeschobenes Diagramm: Amplitudenabnahme bei 393 nm in Abhängigkeit der DNA- P -Konzentration in Einheiten von 10^{-4} M DNA-P. DNA von B.subt W 23.

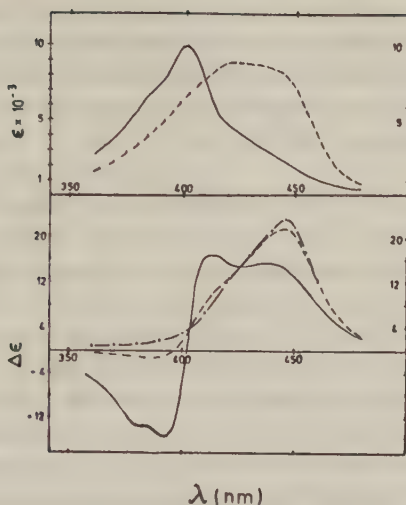


Abb. 28

Vergleich der Veränderungen des Absorptions-(oben) und CD-Spektrums (unten) von Mithramycin bei Komplexbildung mit DNA und Mg^{2+} . Molaritätsverhältnisse Mithra.: Mg^{2+} : DNA- P = 1:0:24 (—), 1:2:24 (----).

Die Stöchiometrie der Komplexbildung wurde weiter verfolgt in einer Meßreihe, deren Ergebnisse in Abb. 29 angegeben sind. In diesem Experiment wurden Antibiotika- und DNA-Konzentration konstant gehalten ($P/D = 6:1$) und nur die Mg^{2+} -Konzentration variiert. Mit steigender Mg^{2+} -Zugabe werden die Doublettbanden in zunehmendem Maße abgebaut, die neue Bande bei 445 nm stärker ausgebildet. Diese Spek-

traländerungen deuten nach den vorher hierfür aufgestellten Kriterien auf Zunahme der Komplexbildung hin. Die Amplitudenabnahme verläuft bei steigender Mg^{2+} -Konzentration exponentiell, aber steiler als für Antibiotikum und Mg^{2+} allein (vergleiche Abb. 25 b).

Im Prinzip lassen sich aus CD-Messungen an Komplexen auch quantitative Aussagen über die Stöchiometrie der Komplexe und die thermodynamischen Parameter des Reaktionsgleichgewichtes gewinnen. Dazu kann man etwa die Methode von PEACOCKE und SKERRETT, (1956) auf CD-Spektren anwenden. Eine zweite Methode wurde vor kurzem von ROSEN (1970) vorgeschlagen. Um aber eine hinreichend kleine Fehlergrenze der Aussage zu erreichen, müssen viele Meßpunkte aufgenommen werden. Bei den relativ großen Volumina der Küvetten für CD-Messungen, den erforderlichen Probenkonzentrationen und den i. a. irreversibel schädlichen Einflüssen der verwendeten UV-Strahlung auf DNA und Antibiotikum werden große Materialmengen benötigt. Da wir in den verfügbaren Materialmengen limitiert waren, haben wir nur jeweils drei bis vier Meßpunkte aufnehmen können. Eine Alternativlösung zur Bestimmung der Gleichgewichtsparameter der Komplexe bietet die Gleichgewichtsdialyse mit radioaktiv markierten Antibiotika in Mikro-Dialysezellen. Darauf haben wir aber wegen zu erwartender großer experimenteller Schwierigkeiten verzichtet.

3.2.1.5 Basenpraeferenz der Chromomycin-Antibiotika

Die Präferenz für (G+C)-reiche DNA kann mit der CD-Methode nachgewiesen werden, wie Abb.30 es zeigt. In diesem Experiment wurden die relativen Konzentrationsverhältnisse der drei Partner konstant gehalten und nur die Herkunft der DNA variiert. Beurteilt nach den aus den vorhergegangenen Ver-

suchen abgeleiteten Kriterien gehen die Spektralveränderungen in Richtung auf steigende Komplexbildung für steigenden Gehalt der DNA an (G+C)-Paaren. Das eingeschobene kleine Diagramm verdeutlicht dies. Das analoge Experiment für Chromomycin ist nicht ganz so klar ausgefallen, zeigt aber deutlich den gleichen Gang.

3.2.1.6 Interpretation der CD-Spektren:

Wir interpretieren unsere Ergebnisse so:

- a) Chromomycin und Mithramycin liegen im freien Zustand in 1/15 M Sörensen Phosphat Puffer pH 7 bei Zimmertemperatur und in einer Konzentration von 10^{-4} M größtenteils als Dimere oder noch höhere Aggregate vor mit einer assoziativen, geordneten Wechselwirkung ihrer Chromophore. Nur mit der Annahme einer geordneten, nicht willkürlichen Wechselwirkung kann die Entstehung der Doubletts im CD-Spektrum an den Stellen der Absorptionsbanden des Chromophors erklärt werden. Eine analoge Doublettaufspaltung einer CD-Bande war uns schon bei Nukleinsäuren und Oligonucleotiden mit regelmäßiger (helicaler) Stapelung der Basenpaare begegnet (siehe Abb. 6, 8). Sie war in diesem Fall Folge der Wechselwirkungen der Übergangsmomente einer Base mit den benachbarten Basen im Stapel. Mg^{2+} ändert die Konformation dieser Dimeren oder höheren Aggregate nicht wesentlich, denn das CD-Spektrum ändert sich bei Mg^{2+} -Zugabe nur wenig. Mit DNA allein treten diese Aggregate in Abwesenheit von Mg^{2+} nicht in Wechselwirkung.
- b) Bei hohen P/D-Verhältnissen werden die Antibiotika-Aggregate in Anwesenheit von Mg^{2+} nicht in der gleichen Konformation an DNA gebunden, die sie auch im freien Zustand haben. Die sich neu ausbildenden CD-

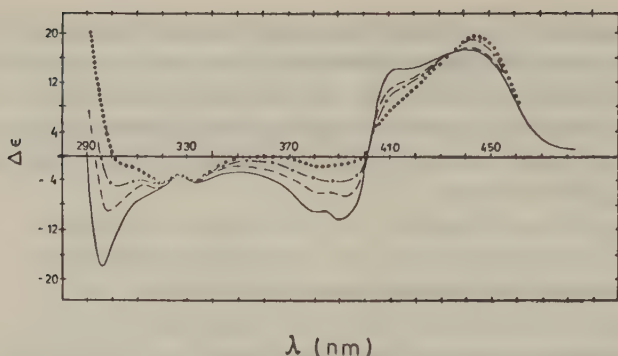


Abb. 29

Mithramycin- Mg^{2+} -DNA-Komplex bei variabler Mg^{2+} -Konzentration und festen konstanten Mithramycin und DNA-Konzentrationen. Mithramycin-Konz. = 0.1 mM = const. Molaritätsverhältnisse Mithramycin: Mg^{2+} :DNA-P: 1:4:6 (—), 1:10:6 (----), 1:20:6 (-.-.-), 1:40:6 (oooooo), Halblogarithmische Darstellung der Amplitudenabnahme in Abb. 25

Banden bei 445 nm und bei 333 nm sowie die neue Absorptionsbande bei 445 nm sprechen für Konformationsänderungen des Chromophors bei Komplexbildung.

- c) Das Verschwinden der Doublets im CD-Spektrum und der Absorptionsbande bei 405 nm bei Komplexbildung entspricht dem Verschwinden von Dimeren oder höheren Aggregaten mit geordneter Wechselwirkung ihrer Chromophore aus der Lösung bei der nahezu vollständigen Bindung aller Chromomycin- und Mithramycinmoleküle bei hohen P/D-Verhältnissen (24:1). Wir nehmen daher an, daß die an DNA gebundenen Moleküle Monomere sind. Unsere Interpretation befindet sich allerdings im Widerspruch zu den Konklusionen

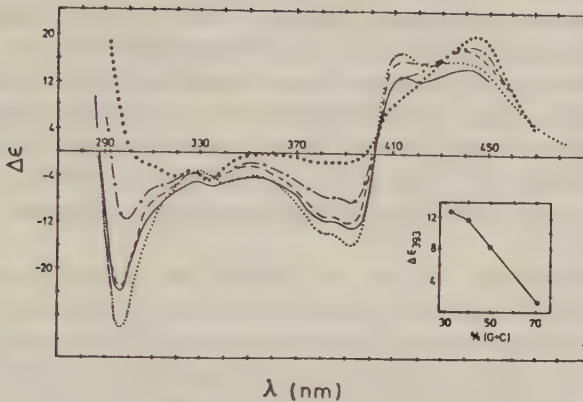


Abb. 30

Vorzugsbindung von Mithramycin an GC-reiche DNA 0.1 mM Mithramycin in allen Proben. Molaritätsverhältnis Mithramycin: Mg^{2+} : DNA-P = 1:2:6 in allen Proben. DNA von *C. johns.* (33 % G+C) (———)., *B. subt.* (43 % G+C) (-----)., *E. coli* (50 % G+C) (-.-.-.) und *S. lutea* (72 % G+C) (.....).

von HAYASAKA und INOVE (1969). Aus uns im Detail nicht ganz einsichtig erscheinenden Experimenten mit der analytischen Ultrazentrifuge hatten diese Autoren den Schluß gezogen, daß das Antibiotikum als Dimer oder höheres Oligomer gebunden wird.

3.2.1.7 Temperaturabhängigkeit der Doublettbande

Um die Details der Komplexbildung besser zu verstehen, haben wir noch folgende beiden Überlegungen angestellt:

Wenn das Antibiotikum im freien Zustand in Form von Dimeren oder höheren Oligomeren vorliegt, und wenn die Doublettstruktur des CD-Spektrums darauf zurückzuführen ist, dann sollte bei höheren Temperaturen diese geordnete Struktur gelockert werden, und die Amplituden der Doublettbande sollten abnehmen. Eine solche Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren wird bei freier DNA und RNA beobachtet. Bei hohen Temperaturen müßte das Monomerenspektrum auftreten.

Unser Experiment zeigte aber gerade das gegenteilige Resultat: nach Erreichen des thermischen Gleichgewichts in einer Mithramycin-Mg²⁺-DNA-Probe bei 25°C wurde der Thermostat für den Küvettenraum umgeschaltet auf 50°C und während des Aufheizens das Spektrum repetitiv in gleichen Zeitintervallen aufgenommen. Sowohl die positive als auch die negative Doublettamplitude nehmen in ihrer Intensität nicht ab sondern zu (Abb. 31).

Eine anfängliche leichte Dissymmetrie der Doublettbande nimmt mit zunehmender Temperatur ab. Der pH des Puffers (0.01 M Na-Phosphat) bleibt stabil : pH 7.01 bei 20°C, pH 7.10 bei 50°C. Diesen Befund können wir nicht eindeutig interpretieren. Es könnte einerseits sein, daß das CD-Spektrum seine "Doublett"-struktur bereits vom Monomer erhält. Das wäre auf Grund der Theorie des Zirkulardichroismus schwer verständlich - aber die Möglichkeit ist nicht auszuschließen. Diese Struktur würde dann nicht von dem Oligomerisierungszustand des Moleküls abhängen, also auch nicht vom Verschwinden der Oligomeren bei höheren Temperaturen. Andererseits könnte es auch sein, daß eine Erwärmung auf 50°C noch nicht genügend Aktivierungsenergie bedeutet, um die Oligomerisierung zu zerstören. Leider konnten wir aus technischen Gründen nicht bei noch höheren Temperaturen messen, um zu verfolgen, ob nach Überschreiten einer möglicherweise existierenden Potentialschwelle die Doublettamplituden nicht doch wieder abnehmen.

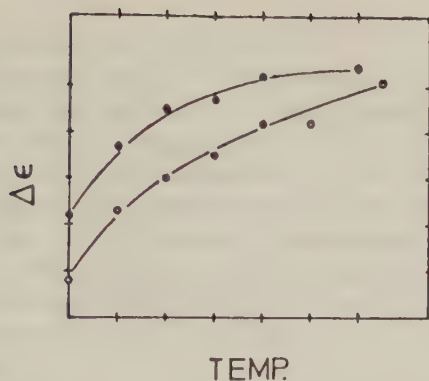


Abb. 31

Temperaturabhängigkeit der Doublettamplitude im Sichtbaren Spektralbereich (ca. 393 nm) von Mithramycin. 0.1 mM Mithramycin in 10 mM Na-Phosphat Puffer, pH 7.04 bei 25°C (linkes Skalenende). Nach Einschalten des Thermostaten auf 50°C wurden in gleichen Abständen 7 Spektren registriert, deren Doublett-Maximal-Intensitäten hier aufgetragen sind. (.-.-.): positives Max., (o-o-o): negatives Max.

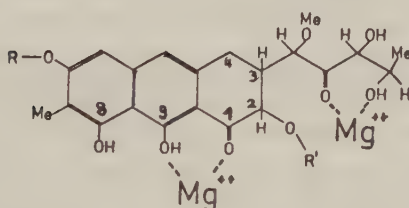


Abb. 32

Mögliche Chelatbindungsstellen für Mg^{2+} -Ionen an Chromomycin und Mithramycin (Numerierung der C-Atome nach MIYAMOTO et al., 1967).

3.2.2.1 Modell des Mg^{2+} -Chelatkomplexes

Eine naheliegende Vorstellung über den modus der Mg^{2+} -Komplex-Bildung des freien Antibiotikums wäre die Annahme einer Chelatbindung an eine der beiden benachbarten Keto-Hydroxyl-Funktionen in den Positionen 2',4' der Seitenkette oder in den Positionen 1,9 des A und B Ringes des Chromophors (Abb. 32).

Um diese Vorstellung zu testen, haben wir drei Versuche konzipiert:

- a) Untersuchung der Beiträge der $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Carbonylgruppen am C 1 des A-Ringes und am C 4' der Seitenkette zum Gesamtzirkulardichroismus des Chromophors in den Spektralbereichen 370-390 nm bzw. 330 nm.
- b) Ersatz der Mg^{2+} -Ionen durch Co^{2+} und Cu^{2+} -Ionen als CD-Sonden. Nach den Resultaten von WARD et al. (1965) wird mit Co^{2+} ein Antibiotikum-Me-DNA-Komplex gebildet, nicht dagegen mit Cu^{2+} . Die Komplexbildung könnte daher in der Absorptionsbande des Co^{2+} einen Zirkulardichroismus induzieren, was bei Cu^{2+} nicht der Fall sein dürfte.
- c) Kernresonanz des Hydroxyl-Protons an C 9 bei Zugabe von Mg^{2+} , um aus einem eventuellen Verschwinden des isolierten Signals dieses Protons entscheiden zu können, ob dieses Proton in die Mg^{2+} -Bindung einbezogen wird oder nicht.

3.2.2.2 Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptions- und CD-Banden

- zu a) Die Carbonylfunktionen sollten nach empirischer Erfahrung in den Wellenlängenbereichen 370-390 nm und um 330 nm absorbieren und auch einen Zirkulardichroismus zeigen. Wenn die CD-Beiträge des Restchromophors diese Carbonyl-Beiträge nicht überdecken, müßte es möglich sein herauszufinden, ob eine der beiden Carbonylfunktionen der Chromomycinantibiotika in die Mg^{2+} -Komplexbildung einbezogen wird oder nicht.

Die Entscheidung ob die CD-Banden im Spektrum des freien Antibiotikums bei diesen Wellenlängen den Carbonylbeitrag zu isolieren gestatten, konnte gefällt werden mittels einer Untersuchung der Abhängigkeit ihrer Intensität vom Lösungsmittel. Es ist bekannt, daß Lage und Intensität von CD-Banden der $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge von Carbonylfunktionen in strenger Korrelation zur Polarität des

Lösungsmittels stehen, oder genauer genommen zum KOSOWER'schen Z-Index des Lösungsmittels, der eine Funktion im wesentlichen der Polarität des Lösungsmittels ist. (Siehe RASSAT in SNATZKE Ed. S. 319 und VELLUZ et. al., S. 81). Die Abhängigkeit der Absorption von Chromomycin von einigen Lösungsmitteln mit über die ganze Skala streuenden Z-Indices ist in Abb. 33 festgehalten, die CD-Spektren in Abb. 34. Die Z-Werte der verwendeten Lösungsmittel sind: H₂O (94.6), Methanol (83.6), Äthanol (79.6), Dimethyl-Formamid (68.5), Chloroform (63), Benzol (54-62). Die Polaritäten sind in fallender Reihenfolge:

Es sind zwar starke Änderungen der CD- und Absorptionsspektren des Antibiotikums in den verschiedenen Lösungsmitteln festzustellen, aber keine Korrelation der Bandencharakteristika (Lage und Intensität) bei 330 nm oder 370-390 nm zu den Z-Werten oder den Polaritäten der Lösungsmittel. Daraus kann geschlossen werden, daß die Beiträge der Carbonylfunktionen von denen anderer Chromophore vollständig überdeckt werden. Damit entfällt für uns die Möglichkeit, den Zirkulardichroismus der Carbonyl-Banden als Sonde für die Mg²⁺-Bindungsstelle im Komplex auszunützen.

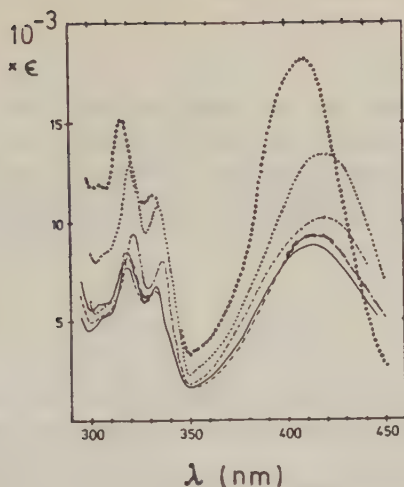


Abb. 33

Absorption von Chromomycin in verschiedenen polaren Lösungsmitteln. Methanol (•••••), Chloroform (....), Benzol (-.-.-), Äthanol (~~~~~), Propanol 1 (-----), Äthylazetat (————).

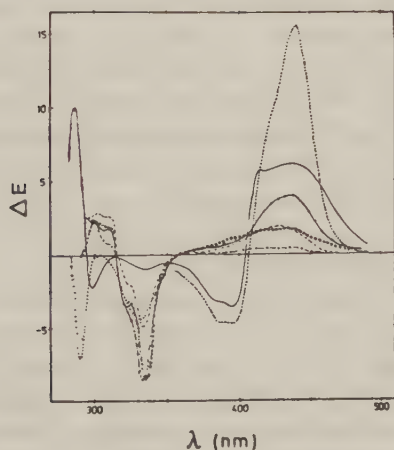


Abb. 34

Zirkulardichroismus von Chromomycin in verschiedenen polaren Lösungsmitteln. Dimethylformamid (....), Wasser (————), Methanol (•—•—•), Äthanol (-----), Benzol (○—○—○), Chloroform (-.-.-).

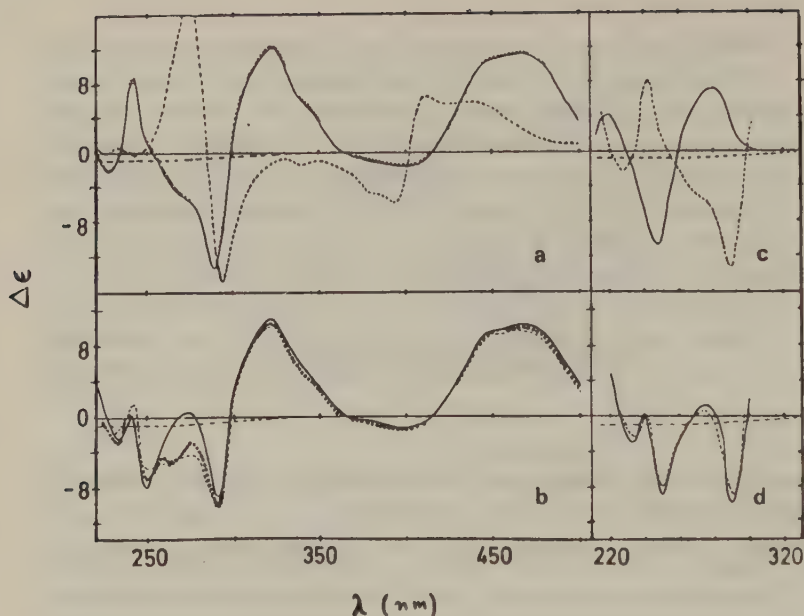


Abb. 35

0.1 mM Mithramycin und Cu^{2+} in 0.1 M NaCl, neutraler pH.

a) Mithram. allein (-----), Mithram. + $2x \text{ Cu}^{2+}$ (———)..
Mithram. + $40x \text{ Cu}^{2+}$ (.....)..
b) Mithram. + 6 x DNA- P + $2x \text{ Cu}^{2+}$ (———)..
" + " + $10x \text{ Cu}^{2+}$ (.....)..
" + " + $40x \text{ Cu}^{2+}$ (-----)..
c) G. johns. DNA (200 ug/ml) in 0.1 M NaCl.
(———)..
d) (———) = Summe der beiden Kurven aus c) (graphisch)..
(-----) = Spektrum des Komplexes aus b)..
Die gestrichelte horizontale Linie im kurzwelligen Teil
gibt die nach der Messung ermittelte Lage der Nulllinie an,

auf die streng genommen noch zu korrigieren wäre. Die hier angegebenen $\Delta\epsilon$ -Werte sind bezgl. der molaren Konzentration des Antibiotikums angegeben, nicht (wie sonst häufig zur Darstellung von Komplexspektren) bezgl. der DNA - P - Konzentration.

3.2.2.3 Co^{2+} und Cu^{2+} -Ionen als Sonden

zu b) Als Vorstudie zu den Untersuchungen mit Co^{2+} und Cu^{2+} -Ionen wurden CD-Spektren von Chromomycin in drei verschiedenen Puffern und von Mithramycin in einem Puffer und in Austauschwasser aufgenommen. Dies erwies sich als erforderlich, da mit diesen beiden Schwermetallionen im Phosphatpuffer nicht gearbeitet werden konnte. (Ausfällung). Chromomycin zeigte in 1/150 M Sörensen Phosphatpuffer, in 10^{-2} M Tris/ 10^{-2} M NaCl und in 10^{-1} M NaCl-Lösung strikt identische Spektren. Mithramycin zeigte in 10^{-1} M NaCl-Lösung ein um ca. 30 % gegenüber 1/15 M Sörensen-Puffer gestauchtes Spektrum, in Austauschwasser ein um ca. 10 % gestrecktes Spektrum. Die Struktur aller Spektren zeigte qualitativ dieselben Merkmale wie im bisher immer benutzten Sörensen Puffer. Die Intensitätsunterschiede könnten eventuell durch einen Fehler in der Konzentrationsbestimmung zu erklären sein, wahrscheinlicher durch einen Lösungsmittel-effekt.

Zugabe von Cu^{2+} -Ionen in der doppelten molaren Konzentration des Antibiotikums (in 10^{-1} M NaCl-Lösung) ändert das CD-Spektrum vollständig: die Doublettstruktur verschwindet (Abb. 35 a). Weitere Erhöhung des Konzentrationsverhältnisses Cu^{2+} / Droge auf 40:1 läßt das Spektrum unverändert - im Kontrast zu der kontinuierlichen exponentiellen Spektralveränderung bei Zugabe steigender Konzentrationen von Mg^{2+} . Die Konformationen des freien Antibiotikums in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen und von Mg^{2+} -Ionen und

auch die Stöchiometrien der Wechselwirkung Antibiotikum-Metallion sind also für beide Ionen stark voneinander verschieden. Zugabe von DNA in konstantem Konzentrationsverhältnis DNA-P/Antibiotikum = 6:1 ändert dieses Spektrum nicht mehr. (Abb. 35 b)). Bei dem Konzentrationsverhältnis Mithramycin :DNA-P:Cu²⁺ = 1:6:2 ist das Komplexspektrum exakt identisch mit der Summe der CD-Spektren der zugegebenen Menge DNA und des (Mithramycin-Cu²⁺) = 1:2 - Komplexes. Bei höheren Cu²⁺/Mithramycin-Konzentrationsverhältnissen ändert sich das Gesamtspektrum nur noch im fernen UV-Bereich, weil überschüssige Metallionen vorhanden sind, die nicht mehr vom Antibiotikum gebunden werden, aber die Struktur und damit das CD-Spektrum der DNA modifizieren. (Siehe Sektion DNA und Metallionen). Dieser Befund bestätigt also exakt den Befund von WARD, et al. (1965), daß Mithramycin mit DNA und Cu²⁺ anstelle von Mg²⁺ keine Komplexe bilden kann. Für Chromomycin fanden wir wieder analoge Verhältnisse.

Auch hier ist für Antibiotikum: Cu²⁺ = 1:2 das Gesamtspektrum des Drei-Komponenten-Gemisches annähernd gleich der Summe der Spektren der gleichen Menge DNA allein und des (Chromomycin-Cu²⁺)-Komplexes. Bei höherem Cu²⁺-Überschuß fällt auch hier die genaue Analyse wieder schwer, da das freie Cu²⁺ die DNA-Struktur modifiziert.

Im Kontrast hierzu finden wir für Co²⁺-Ionen nach dem Kriterium der Additivität der Beiträge im fernen UV Komplexbildung zwischen Antibiotikum und DNA.

Die Spektren von Mithramycin und Co²⁺ in zwei-, zehn- und vierzigfacher molarer Konzentration sind in Abb 36 a wiedergegeben. Wir finden hier wieder wie beim Mg²⁺ und im Unterschied zum Cu²⁺ kontinuierliche Intensitätsänderungen der Amplituden im CD-Spektrum mit steigender Metallionenzugabe - allerdings auch hier keine Doublettstruktur mehr. Zugabe von DNA ändert das Spektrum bereits im Sichtbaren nicht

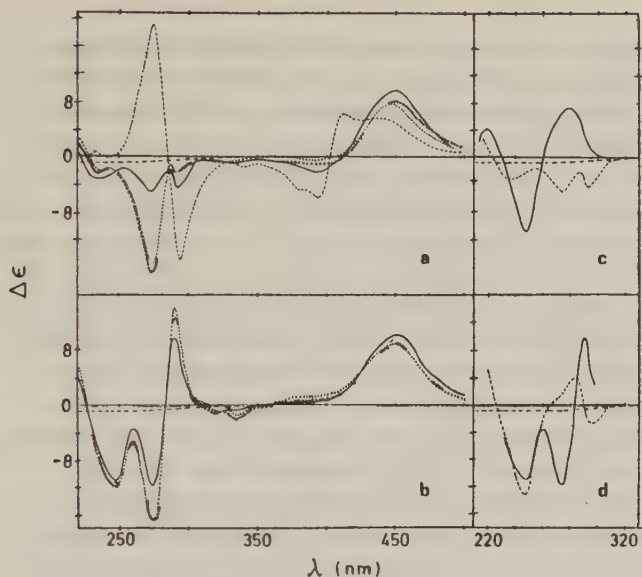


Abb. 36

0.1 mM Mithramycin und Co^{2+} in 0.1 M NaCl.

- a) (-----) freies Mithram., (—) Mithram. + $2x \text{Co}^{2+}$,
 (oooooo) Mithram. + $10x \text{Co}^{2+}$, (.....) Mithram. + $40x \text{Co}^{2+}$.
- b) (—) Mithram. + 6x DNA-P + $2x \text{Co}^{2+}$, (.....) Mithra.
 + 6x DNA-P = $10x \text{Co}^{2+}$, (oooooo) Mithram. + 6x DNA-P
 + $40x \text{Co}^{2+}$.
- c) (—) C. johns. DNA (200 $\mu\text{g/ml}$). Diese DNA in gleicher
 Konzentration und gleicher Kuvette wurde auch in
 a) und b) benutzt. (-----) Mithra. + $2x \text{Co}^{2+}$ aus a).,
- d) (-----) Summe der beiden Kurven aus c).,
 (—) Komplex aus b).

Die gestrichelte horizontale Linie ist die Kuvetten-Nulllinie nach Aufnahme der Spektren (s. Abb. 35.)

Die $\Delta\epsilon$ -Werte sind bezgl. der Molarität des Antibiotikums angegeben (s. Abb. 35).

unwesentlich: letzte Andeutungen einer positiven Bande bei ca. 393 nm verschwinden, und es bleibt ausschließ-lich die Bande bei 445 nm übrig (Abb. 36 b). Die Ereignisse erscheinen analog, wennauch nicht so stark ausgeprägt, wie die Veränderungen bei Komplexbildung mit Mg^{2+} . Bei 320 nm und 333 nm bilden sich die beiden kleinen Banden aus, die wir auch im Komplex mit Mg^{2+} als typisch für gebundenes Antibiotikum angesehen hatten. Das Doublett des freien Mithramycins bei 290 nm hat im Komplex mit Co^{2+} und DNA sein Vorzeichen umgekehrt. Dies ist ein Hinweis auf eine signifikante Konformationsveränderung. (Siehe dazu Abschnitt "Messgrößen und Information", Abb. 5). Diese Vorzeichenumkehr ist in den Proben, die Mithramycin Cu^{2+} und DNA enthalten nicht festzustellen (Abb. 35). Schließlich ist jetzt im fernen UV das Gesamtspektrum des Drei-Komponenten-Gemisches bei keiner Co^{2+} -Konzentration mehr gleich der Superposition von DNA-Spektrum und (Antibiotikum-Metall-Ion)-Spektrum- selbst nicht bei $Co^{2+}/\text{Antibiotikum} = 2:1$. Damit ist aus der CD-Untersuchung die Komplexbildung Mithramycin- Co^{2+} -DNA bewiesen. Für Chromomycin wurden wiederum analoge Verhältnisse gefunden.

Damit ist das Ziel aber nur teilweise erreicht. Das eigentliche Vorhaben, Co^{2+} und Cu^{2+} als Sonde zu benutzen, in deren Absorptionsbanden durch die Komplexbildung im Falle des Co^{2+} ein Zirkulardichroismus induziert werden sollte, (beim Cu^{2+} als Kontrolle nicht) welcher die Analyse der Komplexbildung gestatten sollte, konnte nicht erreicht werden. Zwei Gründe dafür können wir nennen:

- a) Die Absorptionsbanden dieser Ionen im Sichtbaren Bereich, auf die wir ursprünglich gehofft hatten, da sie weitab von den Absorptionsbanden des Chromomycins liegen (Lösungen verschieden gefärbt !) erwiesen sich als viel

zu schwach. Mit Metallionenkonzentrationen, die in sinnvollen Relationen zu den maximal erreichbaren Konzentrationen der anderen Partner stehen, war im Sicht-

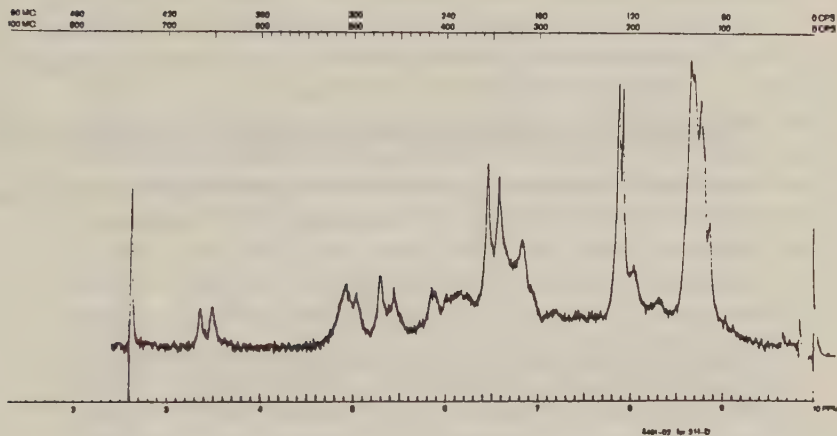


Abb. 37 a)

Protonenresonanz Spektrum von Chromomycin A3 in CDCl_3 .
Signale der Ringprotonen und Seitenketten-protonen.

baren keine Absorption und kein Zirkulardichroismus nachweisbar.

- b) Auch die UV-Absorptionsbanden sind relativ schwach. Wir fanden sie genau in einer Spektralgegend, in der auch die beiden anderen Partner starke Beiträge zum Gesamt-CD-Spektrum liefern, so daß die Analyse der induzierten Änderungen in den um eine Größenordnung schwächeren Metallionenbanden illusorisch wird.

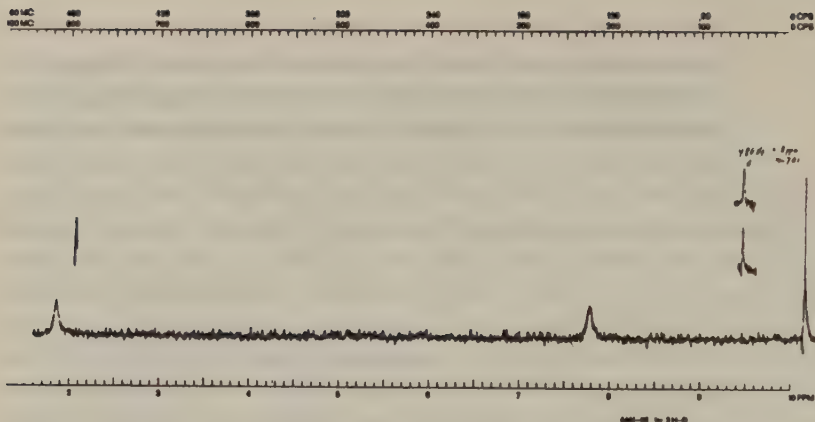


Abb. 37 b)

Protonenresonanzspektrum von Chromomycin A3 in CDCl_3 .
Signale der Hydroxyl-Protonen am C-8 und C-9.

3.2.2.4 Protonenresonanz als Sonde

ad c) Die dritte Möglichkeit mittels einer "Sonde" zu testen, ob der in Abb 32 skizzierte Chelatbindungsmechanismus zutreffend ist oder nicht, bot sich uns durch eine überraschende Eigenschaft des Protonenresonanzspektrums von Chromomycin.

MIYAMOTO et al. (1968) hatten im Rahmen der Strukturaufklärung von Chromomycin A3 beobachtet, daß die Hydroxylprotonen am C-8 und C-9 in deuteriertem Chloroform Signale ergeben, die sich sehr klar von den Signalen der restlichen Protonen der Verbindung unterscheiden lassen. Diese beiden Signale liegen bezüglich des Referenzsignals von TMS (Tetramethylsilan) um 15.2 ppm resp. 9.72 ppm zu niedrigerem Feld ver-

schoben, während alle anderen Protonensignale der Verbindung in der Gegend zwischen 1 ppm und 7.5 ^{ppm} zu niedrigeren Feldern verschoben liegen bzgl. TMS (Abb. 37).

Daraus erhofften wir, daß bei einer Mg^{2+} -Chelatbindung am C-9 das Signal des betreffenden Protons verschwinden müßte, wenn sich das Mg^{2+} -Ion wirklich hier bindet.

Die Schwierigkeit, das Experiment durchzuführen, lag in der Wahl eines geeigneten Lösungsmittelsystems. In Wasser kann nicht gemessen werden, da seine Hydroxylprotonen mit denen des Chromomycins austauschen würden, das Signal dadurch zu höherem Feld hin verschoben würde und somit von den anderen Protonensignalen nicht mehr aufzulösen wäre. In deuteriertem Wasser kann ebenfalls nicht gemessen werden, da auch hier ein OH-OD Austausch stattfinden würde und die Signale der OD-Gruppen an C-8 und C-9 außerhalb des Meßbereichs des Protonenresonanzspektrometers fallen würden. Deuteriertes Chloroform hat den Nachteil, daß $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ nur schwer darin löslich ist und auch wieder austauschende Protonen einschleppt. In einem Vorversuch brachten wir nur 0.01 mg/ml des $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ in Chloroform in Lösung, d. h. nur 5×10^{-5} M. Wir brauchen aber für ein hinreichend intensives Kernresonanzsignal Chromomycin-Lösungen von 1×10^{-3} M bis 5×10^{-3} M. Um äquimolare Konzentrationen an Mg^{2+} zu erreichen, ist die Löslichkeit also um zwei Größenordnungen zu gering. Voll deuteriertes Methanol[†] OD_3OH , das wir uns aus voll deuteriertem Methanol herstellten, blieb schließlich als Kompromisslösung übrig. Einerseits erfüllt es die Voraussetzung als ein Lösungsmittel, in dem hinreichend viel Chromomycin gelöst werden kann, um ein nachweisbares Signal zu erhalten - zum anderen können Mg^{2+} -Ionen hierin in Lösung gebracht werden. Ein Nachteil ist, daß auch hier mit einem Austausch der OH-Gruppen zu rechnen ist und demzufolge mit einer Linienverbreiterung und einer Verschiebung zum höheren Feld hin.

[†] (CD_3OD) kommt ebenfalls wegen des OH/OD Austausches nicht in Betracht.

In Zusammenarbeit mit Herrn Priv. Doz. Dr. Geibel wurden schließlich am 60 MHz Jeol-Spektrometer des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg folgende beiden Versuche durchgeführt:

Versuch 1

- a) In CDCl_3 wurde untersucht, ob bei Mg^{2+} -Zugabe eine Veränderung des Signals des Protons an C-9 festzustellen ist. Ergebnis: Bei Zugabe von $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ bzw. MgClO_4 (wasserfrei) verändert sich das ursprüngliche Spektrum nicht, selbst nicht nach Einwirkung von Ultraschall. Daraus kann geschlossen werden, daß in CDCl_3 sich ein Komplex mit Mg^{2+} an der -OH-Gruppe von C-9 nicht ausbilden kann.
- b) Zugabe von $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ brachte augenblicklich das Proton der nicht - chelatisierten OH-Gruppe an C-8 durch raschen Oh-Austausch zum Verschwinden, wogegen das Proton der OH-Gruppe an C-9 nicht so schnell ausgetauscht wird. Daraus kann geschlossen werden, daß dieses Proton stärker gebunden ist, als das C-8-Proton. Bei anderen Präzedenzfällen, die von Dr. Geibel studiert wurden, bestand ein Konformationsgleichgewicht zwischen einem durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke cheliertem Zustand (I) und einem nicht-chelierten Zustand (II). In zunehmend polaren Lösungsmitteln verschiebt sich das Gleichgewicht in die Richtung der nicht-chelierten Form II, wobei sich nun Wasserstoffbrücken zwischen Lösungsmittel und Substanz (inter-molekulare H-Brücken) ausbilden. Die Zugabe steigender Mengen des polaren Lösungsmittels zu einer CDCl_3 -Lösung von Zustand I ist begleitet von einer Abnahme des Signals für das chelatisierte Proton, dessen Lage ("chemical shift") dabei nahezu konstant bleibt. Das Signal des nicht-chelatisierten Protons des Zustands II nimmt dabei immer mehr zu und verschiebt sich gleichzeitig zu höherem Feld.

Versuch 2

Entsprechend dem eben beschriebenen Aufbrechen von intramolekularen Wasserstoffbrücken in stark polaren Lösungsmitteln war für eine Lösung von Chromomycin in CD_3OH zu erwarten, daß das Signal der HO-Gruppe an C-9 eine zwar ähnliche chemische Verschiebung wie in CDCl_3 aufweisen würde, seine Intensität jedoch sehr gering sein dürfte. Das Signal der OH-Gruppe an C-8 sollte stark verbreitert, u. U. wegen des Austausches mit den OH-Protonen des CD_3OH überhaupt nicht mehr sichtbar und nach höherem Feld hin verschoben sein. Genau dies wurde auch gefunden.

Also liegt das Hydroxylproton des C-9 am Chromomycin in einer durch Wasserstoffbrückenbildung intramolekular stabilisierten Form vor. Diese Tatsache bedingt, daß sein Signal auch in CD_3OH noch zu sehen ist und sich somit zu einer Mg^{2+} -Bindungsstudie eignet, was sonst wegen der Austausch-tendenz dieses Lösungsmittels wie beim Proton des C-8 nicht möglich gewesen wäre.

Bei Zugabe von MgClO_4 (wasserfrei) ist eine Zunahme der Viskosität der Lösung (vermutlich infolge Ausbildung eines $\text{MgClO}_4\text{-CD}_3\text{OH}$ -Solvatkomplexes) und eine Entmischung zu einem zweiphasigen Gemisch zu beobachten. Die Konzentration des Antibiotikums im Deuterochloroform nimmt dabei ab, d. h. es reichert sich in der $\text{MgClO}_4/\text{CD}_3\text{OH}$ -Phase an. Dies bedeutet aber noch nicht, daß ein Chromomycin- Mg^{2+} -Komplex vorliegen muß, sondern kann auch auf eine bessere Löslichkeit in dieser Phase zurückzuführen sein.

Wird diesem zweiphasigen Gemisch weiteres Trideuteromethanol zugesetzt, so erhält man wieder eine homogene Lösung, in der aber noch, ebenso wie in der Trideuteromethanol-Lösung ohne MgClO_4 , bei starker Vergrößerung, das chelatisierte OH-Proton nachzuweisen ist. Es lassen sich somit keine Hinweise für das Vorliegen eines Chromomycin- Mg^{2+} -Komplexes durch NMR-Messungen erbringen.

Das muß aber nicht heißen, daß der in Abb. 32 vorgeschlagene

Mg²⁺-Bindungsmodus nicht dennoch zutreffend sein könnte, da die NMR-Messungen unter der Schwierigkeit litten, genügend Mg²⁺ in Lösung zu bringen. Wenn die Carbonylfunktion an C 1 in die Mg²⁺-Chelatbindung mit einbezogen wird, so ist dies im NMR-Spektrum nicht zu sehen, da hier kein Proton ein Signal geben kann. Im UV-Absorptionsspektrum aber kann Komplexbildung an dieser Gruppe Absorptionsänderungen der $\pi \rightarrow \pi^*$ und $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge des Carbonylchromophors hervorrufen.

Unsere Lösungsmittelreihe hat aber keine Hinweise ergeben, daß die im UV-Absorptionsspektrum des Chromomycins bei 315 und 340 nm liegenden Banden den Carbonylchromophoren zuzuordnen sind - die Carbonylbeiträge in dieser Spektralregion werden von Beiträgen anderer Chromophore überdeckt. Daher ist der in Abb. 32 vorgeschlagene Mg-Chelatkomplex und die weiteren Details seiner Anlagerung an DNA trotz aller unserer Bemühungen durch die geschilderten Experimente weder zu widerlegen noch direkt zu beweisen.

3.2.3 Bindungsstudien mit Nogalamycin und Daunomycin im sichtbaren Spektralbereich und im nahen UV

3.2.3.1 Nogalamycin; Untersuchung der Basenpräferenz

Fragestellung: von BHUYAN und SMITH (1965) wurde behauptet, Nogalamycin binde sich präferentiell an AT-reiche DNA. Von KERSTEN (1969, persönl. Mitteilung) wurde diese Behauptung jedoch bezweifelt. Wir wollten daher prüfen, ob sich aus zirkulardichrographischen Untersuchungen ein Hinweis für oder gegen eine präferentielle Bindung von Nogalamycin an AT-reiche DNA ergibt.

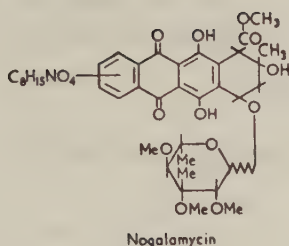


Abb. 38

Nogalamycin; MW = 793 dalton

Durchführung: Für eine erste Testreihe wurde *Cytophaga johns.* DNA gewählt, die von unseren verfügbaren bakteriellen DNA-Spezies den höchsten AT-Gehalt hat. Experimentelle Details sind den Legenden zu den Abbildungen zu entnehmen. In Abb. 39 a) sind die Spektren der Nogalamycin-DNA-Komplexe für variable molare Konzentrationsverhältnisse DNA-P/Antibiotikum im Vergleich zum Spektrum des freien Antibiotikums abgebildet.

Wir wollten mit diesem ersten Versuch feststellen, ob sich die Assoziation des Antibiotikums an DNA überhaupt in gut meßbaren Spektraländerungen der CD-Spektren verfolgen läßt, und in welchem Bereich des molaren Konzentrationsverhältnisses DNA-P/Antibiotikum (abgekürzt: P/D-Verhältnis) sich die größten Spektraländerungen finden. Abb. 39 a) zeigt, daß sich die Komplexbildung im sichtbaren Spektralbereich in der Tat bei den Wellenlängen 465 nm, 355 nm, 315 nm und

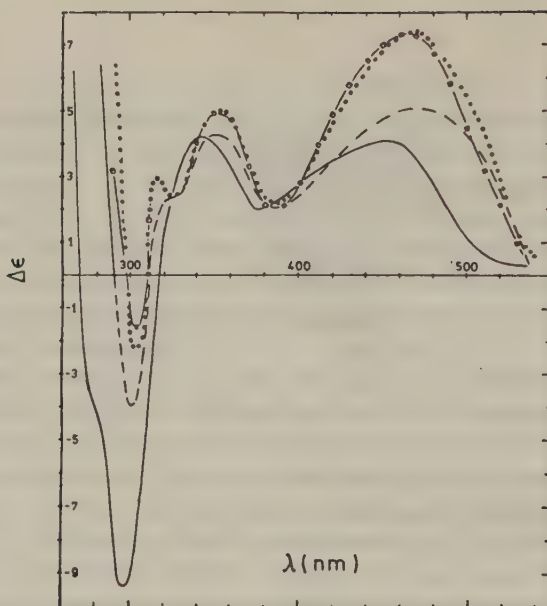


Abb. 39 a)

CD-Spektren von Nogalamycin-DNA-Komplexen in PE-Puffer (1 mM Na_2HPO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 7.6). (—) freies Nogalamycin., (0.14 mM). (-----) Nogalam. + C.johnsonii DNA- P im Molaritätsverhältnis $P/D = 3.5 : 1.$, (-□-□-□-) $P/D = 7 : 1.$, (.....) $P/D = 14:1.$, Nogalamycin ist schlecht wasserlöslich, Es wurde in einem Mörser pulverisiert, mit einer kleinen Menge Puffer angefeuchtet, im Endvolumen aufgenommen und 40^h unter Lichtschutz im Kühlraum mit einem Magnetrührer gerührt. Dann wurde abzentrifugiert (30 min bei 15 000 x g) und die Extinktion im Überstand bestimmt. Die molaren Antibiotikakonzentrationen wurden aus der Extinktion berechnet mit dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{475} = 10\ 000$.

305 nm gut verfolgen läßt. Abb. 39 b) zeigt, daß bei siebenfachem Überschuß an DNA-P die Amplitudenänderungen bereits maximal ausgeprägt sind.

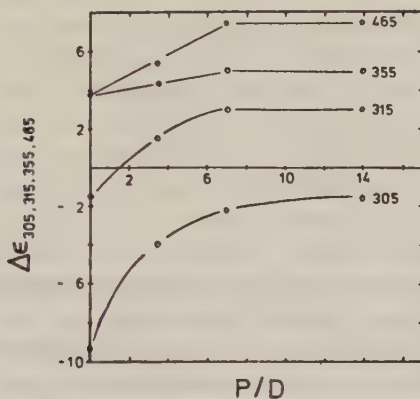


Abb. 39 b)

Amplitudenvariationen in der Versuchsserie aus Abb. 39 a).

Daher wurden die folgenden Experimente zur Untersuchung auf eine praeferentielle Bindung des Antibiotikums an AT-reiche DNA bei den P/D-Verhältnissen 3.5 und 7 durchgeführt. Hierfür konnte nach dem Ergebnis des ersten Versuchs angenommen werden, daß die Bindungsorte an der DNA noch nicht ganz mit Antibiotikum abgesättigt sind.

Die CD-Spektren der Komplexe von Nogalamycin mit DNA-Spezies unterschiedlichen AT-Gehalts sind in Abb. 40 angegeben.

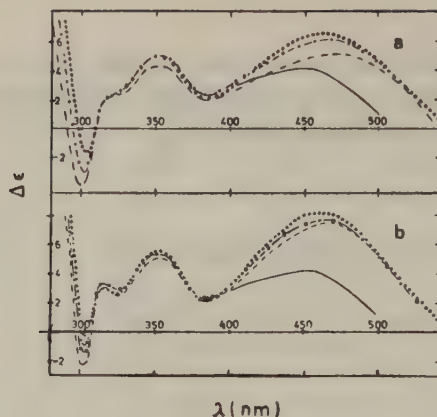


Abb. 40 a)

Untersuchung der Basenpräferenz der Nogalamycin-DNA-Bindung a) $P/D = 3.5 : 1$., b) $P/D = 7 : 1$.,

(—) freies Nogalamycin., (-----) *C.johnsonii*-DNA (33 % GC)., (-□-□-□-) *B.subt.* DNA (43 % GC)., (-.-.-.-) *E.coli* DNA (50 % GC)., (ooooooo) *S.lutea* DNA (72 % GC).,

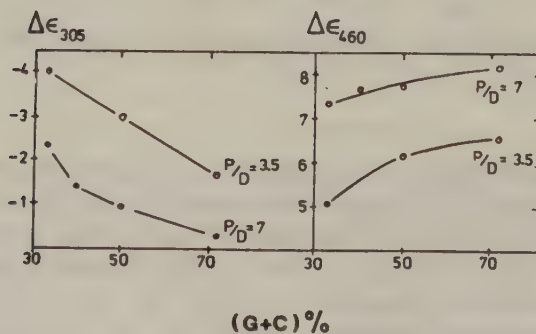


Abb. 40 b)

Amplitudenvariationen in Funktion des DNA-GC-Gehaltes aus der Versuchsreihe zu Abb. 40 a)

Schlußfolgerungen:

- a) Das CD-Spektrum des Antibiotikums im Sichtbaren Bereich ändert sich bei Assoziation an DNA. Daraus kann auf eine Änderung der Elektronenstruktur des Chromophors geschlossen werden.
- b) Die Intensitätserhöhungen der Banden bei 470 nm und 305 nm können als Meßgrößen für das Ausmaß der Assoziation herangezogen werden.
- c) Für $P/D \geq 7$ ($r \leq 0.14$) sind die Amplitudenänderungen maximal ausgeprägt und ändern sich kaum noch mit steigendem Wert des Bindungsparameters r .
- d) Im Bereich kleiner r -Werte liegt neben gebundenem Antibiotikum noch relativ viel freies Antibiotikum in der Lösung vor. Setzt man daher gleiche totale Konzentrationen an Antibiotikum zu gleichen totalen Konzentrationen an DNA verschiedenen AT-Gehalts, so ist die Anreicherung an gebundenem Antibiotikum ein Maß für die Intensität der Bindung an die jeweilige DNA-Spezies.

Nach diesem Kriterium der Annäherung der Spektren an das Grenzspektrum für gebundenes Antibiotikum (Spektren für $P/D = 7$ in Abb. 39 a)) sagt das Resultat der Versuchsreihe bei $P/D = 3.5$ aus, daß Nogalamycin keine Praeferenz für AT-Paare zeigt, sondern eher eine leichte Präferenz für GC-Paare. Die Größenordnung der gemessenen Unterschiede übersteigt jedoch die Grenzen des Fehlerbereichs der Messung nur wenig. Daher wäre eine weitere Bestätigung dieser Aussage mit anderen Methoden wünschenswert.

3.2.3.2 Assoziation von Daunomycin an DNA. CD-Bidnungsstudien im Sichtbaren und im nahen UV-Bereich.

Die Fragestellung war auch hier wie beim Nogalamycin zunächst: läßt sich die Assoziation von Daunomycin an DNA

zirkulardichrographisch verfolgen?

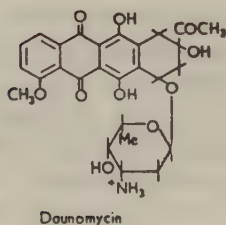


Abb. 41

Daunomycin. , MW = 530 dalton, MW (Daunom.-Hydrochlorid) = 560 dalton.,

Abb. 42 zeigt, daß sich die Komplexbildung leicht anhand der Amplitudenänderungen bei 305 nm oder 510 bis 530 nm untersuchen läßt. Die größte Amplitudenänderung im sichtbaren Spektralbereich findet sich bei 510 nm. Daher wurde die Komplexbildungskinetik bei dieser Wellenlänge verfolgt. (Abb. 43). Die Amplitudenänderung wurde logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen um zu untersuchen, ob die Komplexbildung etwa einer einfachen exponentiellen Kinetik folgt oder eine aus wenigen exponentiellen Elementarprozessen unterschiedlicher Zeitkonstanten zusammengesetzte Reaktion ist. In diesem Falle hätte der halblogarithmische Plot eine Gerade oder eine aus wenigen Geraden Teilstücken unterschiedlicher Steigung zusammengesetzte Kurve sein müs-

sen. Dies ist aber nicht der Fall. Daher haben wir von einer weiteren Untersuchung dieser kompliziert erscheinenden Kinetik abgesehen. Das Komplexbildungs-Gleichgewicht wird streng erst etwa 2 Stunden nach Zusammengeben der Partner erreicht.

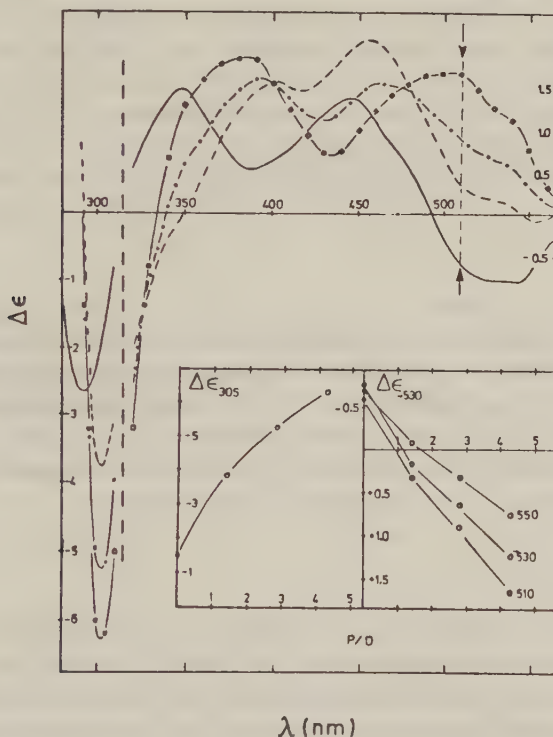


Abb. 42

CD-Spektrum des Daunomycin-DNA-Komplexes im Sichtbaren Spektralbereich. PE-Puffer pH 7.6., (—) freies Daunomycin. (-----) DNA - P : Daunomycin im Molaritätsverhältnis P/D = 1.4:1., (-.-.-) P/D = 2.8:1., (-□-□-□-) P/D = 4.25:1., DNA von *S. lutea*, 72 % (G+C).,

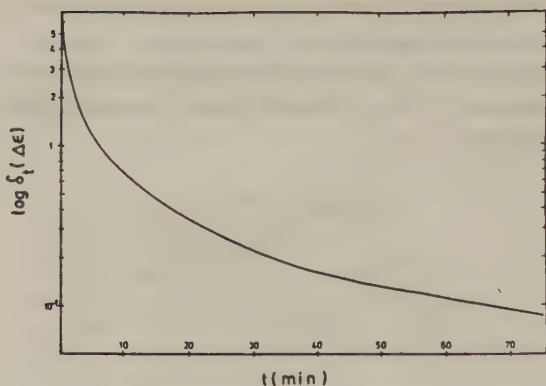


Abb. 43

Kinetik der Daunomycin-DNA-Komplexbildung. 0.26 mM Daunomycin, 2.25 mM DNA- P., P/D = 8.6:1., Ordinate: $\log \delta_t(\Delta\epsilon) = \log [\Delta\epsilon_{510}(t) - \Delta\epsilon_{510}(t_\infty)]$, t = Zeit in Minuten nach Zusammengabe der beiden Komplexpartner; t_∞ = Zeit des Erreichens des Gleichgewichts, in min nach Zusammengabe der Partner.

Wir haben dieses Resultat hier angeführt, obwohl wir selber nicht die Gelegenheit hatten, die Kinetik weiter zu verfolgen, da wir darauf hinweisen möchten, daß sich derartige kinetische Untersuchungen im Prinzip zur Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten ausnützen lassen und daher wertvolle Information liefern können.

3.2.4 Bindung von Nogalamycin und Daunomycin an DNA. Messungen im fernen UV-Bereich

Fragestellung: In den vergleichenden Studien der Bindung von Nogalamycin, Daunomycin, Chromomycin, Mithramycin und Ethidiumbromid an DNA sollte geprüft werden, ob sich für die erstgenannten Antibiotika zirkulardichrographisch Hinweise über den Bindungsmodus gewinnen lassen. Insbesondere sollte im Vergleich zu den bekanntermaßen intercalierenden Amnioacridinen und zu Ethidium-Bromid untersucht werden, ob es eine Möglichkeit gibt, ein allgemeines zirkulardichrographisches Kriterium für intercalative Bindung abzuleiten.

3.2.4.1 Nogalamycin

Die Absorptionsspektren von Nogalamycin und Daunomycin-Hydrochlorid sind in Abb. 44 angegeben.

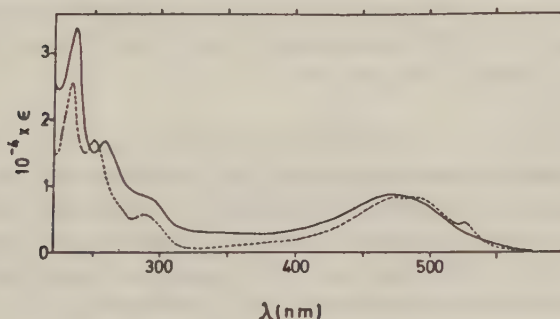


Abb. 44

Absorptionsspektrum von Nogalamycin in PE-Puffer (——) und Daunomycin Hydrochlorid in Äthanol (-----) nach

BERNARD, BOIRON et al (1968). Aus Daten von CALENDI und DIMARCO (1965) ist für Daunomycin in H_2O zu entnehmen: $\epsilon_{475} = 9250$.

Die im Folgenden gezeigten Meßreihen wurden mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{475} = 11\ 200$ für Nogalamycin ausgewertet, der, (wie eine spätere Neubestimmung ergab, WARING, 1969) um ca. 10 % zu hoch liegt. WARING gibt an $\epsilon_{475} = 9860$. Diese Differenzen sind möglicherweise durch Fehler in der Bestimmung der Nogalamycin-Konzentration in den Eichlösungen entstanden, die auf die schlechte Wasserlöslichkeit des Antibiotikums zurückzuführen sind.

Die CD-Spektren von 11 Proben mit Nogalamycin-Kalbs-Thymus-DNA-Komplexen wurden gemessen. Dabei variierten wir die molaren Konzentrationsverhältnisse Antibiotikum/DNA- P (abgekürzt D/P) in kleinen Intervallen im Bereich 0.038 bis 0.567, da nach den Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich für diese Werte die größten Spektraländerungen zu erwarten waren. Weitere experimentelle Details sind der Legende zu Abb. 45 a) zu entnehmen. Dort sind einige Spektren dieser Meßreihe abgebildet.

In Abb. 45 b) sind die CD-Differenz-Spektren einiger Proben derselben Meßreihe abgebildet. Um die Information, die in den Spektren der Komplexe steckt, klar herauszuarbeiten, haben wir hier vom CD-Spektrum eines Komplexes das Spektrum freier DNA derselben Konzentration, in der sie in der betreffenden Komplex-Probe vorliegt, abgezogen.

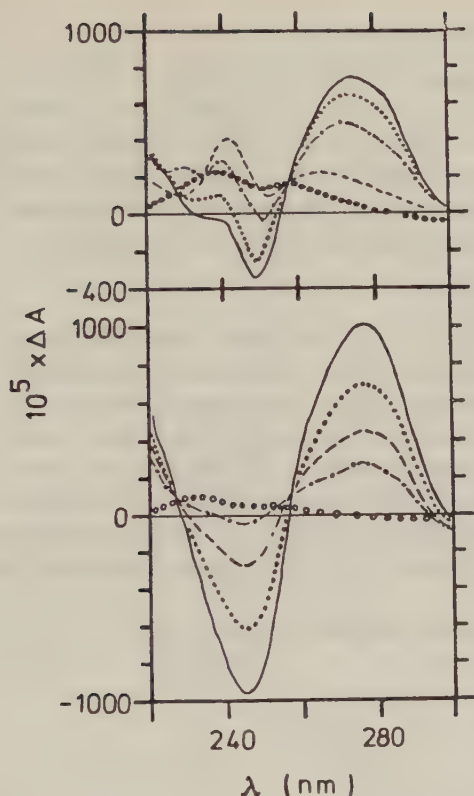


Abb. 45 a)

CD-Spektren der Komplexe von Nogalamycin (oben) und Daunomycin (unten) mit Kalbs-Thymus DNA.

Nogalamycin: (—): DNA-P = 2.11 mM., D/P = 0.038;
 (.....): DNA-P = 1.69 mM; D/P = 0.048; (-.-.-.):
 DNA-P = 1.06 mM; D/P = 0.076; (-----) DNA-P = 0.7 mM;
 D/P = 0.114; (ooooooo): DNA-P = 0; Nogalamycin allein
 in der Konz. 8×10^{-5} M, die in allen Proben dieser Meß-

reihe eingesetzt wurde.

Daunomycin: (————): DNA-P = 3.52 mM; D/P = 0.0193;
(.....): DNA-P = 2.95 mM; D/P = 0.023; (-----): DNA-P =
1.83 mM; D/P = 0.037; (-.-.-.-): DNA-P = 0.705; D/P =
0.0965; (oooooooo): DNA-P = 0; Daunomycin allein in der
Konz. 6.8×10^{-5} M, die in allen Proben dieser Meßreihe
eingesetzt wurde.

Die Ordinatenmeßgröße ΔA ist definiert durch $\Delta \epsilon \cdot c \cdot d = \Delta A$.
Es ist also die noch nicht auf molekulare Eigenschaften
reduzierte Größe, da es hier im UV nicht sinnvoll ist,
durch die molare Konzentration des Antibiotikums allein
zu dividieren, da auch die DNA in diesem Bereich einen
Beitrag liefert. Die "makroskopische" Meßgröße ΔA ent-
hält aber die gesamte Information über das System, da in
allen Ansätzen die eingesetzte Antibiotika-Konzentration
die gleiche ist.

Der Puffer ist 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7.01 bei 20°C.

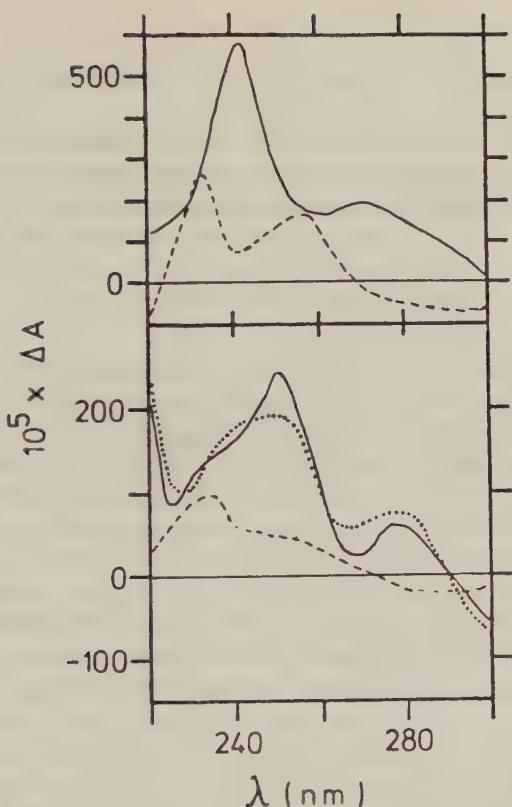


Abb. 45 b)

Differenz-CD-Spektren von Nogalamycin (oben) und Daunomycin (unten).

Nogalamycin: (—): ein mittleres CD-Differenz-Spektrum über eine Reihe von Proben mit verschiedenen r Werten, deren CD-Differenz-Spektren alle so dicht am hier gezeichneten liegen, daß die Abbildung aller Spektren unübersichtlich geworden wäre. (-----) Spektrum des freien Antibiotikums.

Daunomycin: (—) Spektrum einer Probe mit $D/P = 0.020$; (.....) Spektrum einer Probe mit $D/P = 0.087$; (-----) Spektrum des freien Antibiotikums.

3.2.4.2 Daunomycin

Es wurden zehn Proben mit Daunomycin-Kalbsthymus-DNA Komplexen angesetzt. Bei konstanter Antibiotikakonzentration wurde die DNA-Konzentration und damit der D/P-Wert im Bereich zwischen 0.019 und 0.48 variiert. Die CD-Spektren einiger dieser Proben sind in Abb. 45 a) aufgeführt, die CD-Differenzspektren in Abb. 45 b).

Um die Spektren der Komplexe quantitativ auswerten zu können, wurde ein Gleichgewichtsdialyseexperiment zur Bestimmung der Bindungsisotherme durchgeführt. Für Daunomycin und Nogalamycin erwies sich in unseren Meßreihen die spektrophotometrische Bestimmung der Bindungsisotherme nach PEACOCKE und SKERRETT (1956) als nicht streng anwendbar. Für die Proben unserer Meßreihen fanden wir nämlich in den Absorptionsspektren nur angenähert, aber nicht streng genommen isosbestische Punkte. Damit die Methode nach PEACOCKE und SKERRETT anwendbar ist, muß aber ein strenger isosbestischer Punkt vorliegen, d. h. es darf für das Antibiotikum im Bereich niedriger r -Werte nur zwei Zustände geben: frei und an DNA in einem einzigen Bindungstyp gebunden. Fehlt der isosbestische Punkt, so gibt es bereits bei niedrigen r -Werten mehr als einen Bindungstyp. In diesem Falle kann die Bindungsisotherme exakt nur mit einer Gleichgewichtsdialyse bestimmt werden. Die Dialyse-Resultate sind zwar in diesem Fall auch schwierig weiter bis zu den Assoziationskonstanten auszuwerten, aber die bestimmte Isotherme ist dennoch korrekt. Wir brauchen zur Auswertung der CD-Spektren der Komplexe nur die Isotherme. Mit ihrer Hilfe ermitteln wir für jede Probe mit bekannter eingesetzter DNA- und Antibiotikakonzentration die Konzentration an gebunden vorliegendem Antibiotikum c_{geb} und damit den Wert des Bindungsparameters r . Das Verfahren dazu wird weiter unten geschildert. Die Definitionen der

zur Auswertung des Experiments gebrauchten Größen sind folgende:

c_p : = molare Konzentration an Nukleotiden der DNA-Lösung, die in der Probe vorliegt; $c_p = \text{DNA} - \text{P}$.

c_{total} : = $c_{\text{frei}} + c_{\text{geb}} = c_{\text{frei}} + r \cdot c_p$

c_{total} : = totale molare Konzentration an Antibiotikum, die in einer Probe vorliegt. Diese setzt sich zusammen aus der Konzentration c_{geb} an gebundenen und der Konzentration c_{frei} an neben dem Komplex noch frei in der Lösung vorliegendem Antibiotikum

r : = c_{geb}/c_p = Bindungsparameter

Bindungs-
isother-
me = die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme, die graphische Darstellung der Abhängigkeit des Bindungsparameters r von c_{frei} .

Die gemessene Bindungsisotherme ist in Abb. 46 dargestellt. Die experimentellen Einzelheiten sind in der Legende zu dieser Abbildung angegeben. Die numerischen Werte der Meßgrößen, mit denen diese Isotherme gezeichnet wurde, sind in Tabelle enthalten.

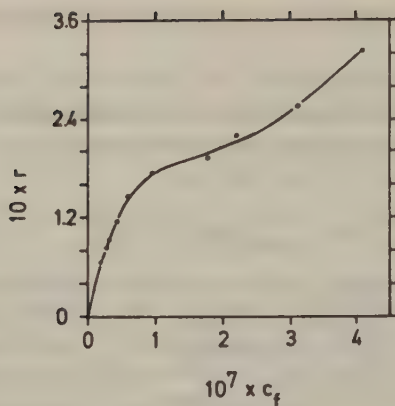


Abb. 46

Langmuir Adsorptionsisotherme von Daunomycin an Kalbs-Thymus DNA.

Die Dialyse wurde durchgeführt in zylindrischen Plexiglas-Doppelzellen, (beschrieben in der Dissertation ERF-MANN, 1969) mit 2.0 ml Füllvolumen in jeder Kammerhälfte. Die Kammerhälften sind getrennt durch eine Dialysemembran aus Cellulose-Material (Visking-SERVA) mit Porendurchmesser von 15-20 Å⁰ und Dicke von 0.025 mm. Die Membran wird vorbehandelt durch Kochen in Na-Carbonat und EDTA nach RICHARDSON (1966). In die linke Kammerhälfte wurde jeweils 2.22×10^{-4} M Antibiotikum gegeben, in die rechte Kammerhälfte variable Konzentrationen an DNA. Nach 48 Stunden gleichmäßigen Schüttelns aller Kammern unter Lichtschutz bei Zimmertemperatur wurden die Lösungen aus den Zellen entnommen und die Extinktion der Lösung aus der DNA-freien Kammer gemessen. Diese Extinktion E_{frei} ist eine Maß für die Konzentration an freiem Antibiotikum, die im Gleichgewicht in beiden Kammern gleich ist. Danach wurde

je 1 ml der Lösungen aus den Kammerhälften mit DNA mit 1 ml gesättigter K Cl Lösung versetzt und die DNA mit 3 ml kaltem Äthanol gefällt. Dabei gibt die DNA das gebundene Antibiotikum quantitativ wieder frei. Die jetzt gemessene Extinktion E_{total} ist ein Maß für die Summe der Konzentrationen an freien und (ehemals) gebundenem Antibiotikum. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten werden die Extinktionen in molare Konzentrationen umgerechnet. Nach Abzug der vorher ermittelten Konzentration c_{frei} des freien Antibiotikums behält man so die Konzentration c_{geb} des gebundenen Antibiotikums übrig. Da die eingesetzte DNA-Konzentration c_p bekannt ist, kann nach der oben eingegebenen Definitionsgleichung der Wert des Bindungsparameters r für jede Probe errechnet und gegen den zugehörigen Wert von c_{frei} aufgetragen werden.

Tabelle IV

Auswertung der Daunomycin DNA Bindungsisotherme ⁺

Zelle no	E_{total} 480 nm	E_{frei} 480 nm	C_{frei} $\times 10^6 \text{ M}$	$E_{\text{tot}} - E_{\text{frei}}$ $= E_{\text{geb}}$	C_{geb} $\times 10^7 \text{ M}$	DNA-P $\times 10^6 \text{ M}$	r
2	2.282	---	---	2.282	4.149	7.2	.0576
3	2.343	0.020	1.79	2.323	4.223	6.4	.0659
4	2.580	0.031	2.77	2.549	4.634	5.6	.0827
5	2.492	0.034	3.04	2.458	4.469	4.8	.0931
6	2.576	0.048	4.29	2.528	4.596	4.0	.1149
7	2.626	0.066	5.89	2.566	4.665	3.2	.1457
8	2.397	0.107	9.55	2.290	4.163	2.4	.1734
9	2.182	0.247	22.05	1.933	3.518	1.6	.2198
10	1.880	0.460	41.07	1.420	2.582	0.8	.3227
---	---	---	---	---	---	---	---
12	2.251	0.130	11.6	2.12	3.854	2.8	.1376
13	2.304	0.199	17.8	2.105	3.827	2.0	.1913
14	2.044	0.351	31.3	1.693	3.078	1.2	.2565

⁺ Unter Zugrundelegung von $\epsilon_{480} = 11200$

Aus der Form der ermittelten Bindungsisotherme kann entnommen werden, daß es für Daunomycin nicht nur einen Typ der Bindung an DNA gibt. Im Falle nur eines Bindungstyps bei niedrigen r -Werten müßte die Kurve nach dem Abknicken bei $r \approx 0.18$ ein Plateau erreichen und dürfte erst bei viel höheren Konzentrationen freien Antibiotikums wieder zu höheren r -Werten hin abknicken. Der frühe Wiederanstieg der Bindungsisotherme besagt das relativ frühzeitige Einsetzen eines zweiten Bindungsmodus bei Konzentrationen, bei denen die Bindungsorte der DNA für Bindung im ersten Typ noch kaum abgesättigt sind. Die Tatsache, daß er zweite Anstieg nicht steil erfolgt, sondern relativ langsam, deutet sogar darauf hin, daß mehrere zusätzliche Bindungstypen auftreten: etwa Typ I = intercaliertes Antibiotikum ohne Wechselwirkung mit anderen Antibiotika Molekülen. Typ II = intercaliertes Antibiotikum mit Wechselwirkung zu benachbart intercalierten Molekülen, Typ III = intercaliertes Molekül in Wechselwirkung mit außen an der DNA angelagerten anderen Antibiotikamolekülen etc.

Aus der Form der Bindungsisotherme wird nachträglich verständlich, warum es in den UV-Absorptionsspektren keinen isosbestischen Punkt gab und warum damit die Messung der Bindungsisotherme mit der spektrophotometrischen Methode nicht durchführbar war. Aus diesem Grunde ist es auch nicht sinnvoll, einen SCATCHARD-plot anzufertigen, da die Auflösung nach den Bindungskonstanten mehrerer zusätzlich einsetzender Bindungstypen nicht durchführbar ist.

Auswertung der CD-Spektren der Komplexe mit Hilfe der Bindungsisotherme

Für die Proben der Komplexe, deren Spektren in Abb. 45 a) abgebildet sind, sollen die Konzentrationen c_{frei} und c_{geb} ermittelt werden, damit die Amplituden der Komplex-Spektren

korrekt zerlegt werden können in einen Beitrag vom freien Antibiotikum und einem Rest vom gebundenen Antibiotikum (+ Beitrag der DNA). Dazu probiert man für jede Probe einen geschätzten c_{frei} -Wert, entnimmt den Wert r dazu aus der Bindungsisotherme (Abb. 46), berechnet mit diesem r -Wert den Wert für c_{geb} , bildet die Summe $c_{\text{frei}} + c_{\text{geb}}$ und prüft, ob diese tatsächlich gleich der eingesetzten Antibiotikakonzentration c_{total} für diese Probe ist. Dieses Probier-Verfahren ("trial and error"-Verfahren) wird für jede Probe so lange durchgeführt, bis die zu einem gegebenen Wertepaar (c_{total} , c_p) gehörige eindeutige Kombination von c_{frei} und r gefunden ist. Für die zehn Proben der Meßreihe "Daunomycin + DNA", deren CD-Spektren den Abbildungen 45 a) und 45 b) festgehalten sind, finden wir nach diesem Verfahren die in der Tabelle V angegebenen Werte.

Tabelle V

Nach dem "trial and error"-Verfahren aus der Bindungsisotherme ermittelte Werte (c_{frei} , r) für die Daunomycin-DNA-Komplexe

Probe No.	$c_{\text{total}} \times 10^5 \text{ M}$	$c_p \times 10^5 \text{ M}$	$c_{\text{frei}} \times 10^5 \text{ M}$	r
9	6.79	333	0.05	0.020
10	"	280	0.05	0.024
11	"	227	0.07	0.030
12	"	173	0.10	0.039
13	"	133	0.13	0.050
14	"	93.3	0.20	0.071
15	"	66.7	0.33	0.087
16	"	40.0	0.68	0.153
18	"	---	6.79	

Die CD-Komplexspektren vor Abzug des DNA-Anteils werden jetzt mit Hilfe der in Tabelle V angegebenen Werte aufgeschlüsselt. Dabei wird auf die Meßgröße ΔA zurückgegriffen, die definiert ist als:

$$\Delta A = \Delta \epsilon \cdot c \cdot d$$

ΔA ist im Zirkulardichroismus die analoge Meßgröße zur integralen Extinktion in der Absorptionsspektrophotometrie:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

vor Reduktion auf molekulare Größen. Man kann jetzt versuchen, das Antibiotikum einmal nur als eine Perturbation des CD-Spektrums der DNA aufzufassen, das in diesem ferneren UV-Bereich bei den benützten Konzentrationsverhältnissen dominiert. Man berechnet also $\Delta \epsilon_p$ nach:

$$\Delta \epsilon_p(\lambda) = \Delta A(\lambda) / c_p \cdot d$$

d. h. man bezieht auf die molare Konzentration an DNA-Nukleotiden anstatt auf die molare Antibiotikakonzentration. Dieser spezifische Dichroismus pro Mol DNA-Nukleotid an den Wellenlängen des Maximums und des Minimums des DNA-CD-Spektrums ist in Abb. 47 gegen den Bindungsparameter r aufgetragen. Man findet eine kontinuierliche Variation der CD-Amplituden mit dem Bindungsparameter r . In der Abbildung wurde durch die Meßpunkte eine Gerade gelegt. Bei einer späteren, genaueren Auswertung zeigte es sich, daß es korrekter ist, die Punkte im Anfangsteil durch eine Gerade zu verbinden, die später in eine gekrümmte Kurve abbiegt. Dies bedeutet, daß mit zunehmender Anzahl an DNA gebundener Antibiotika-Moleküle eine kooperative Wechselwirkung der gebundenen Chromophore untereinander einsetzt. Das Ausmaß der kooperativen Effekte ist nicht sehr groß - die Abweichung von der Geraden in Abb. 47 nicht sehr stark - aber definitiv vorhanden, wie es später auch die Matrix-Rang-Analyse bestätigt.

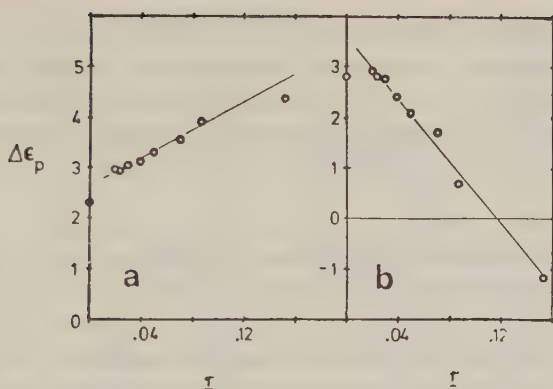


Abb. 47

Amplituden bei 275 nm (a) und 245 nm (b) ($-\Delta\epsilon_p$) der CD-Spektren von Daunomycin-DNA-Komplexen rückgerechnet pro Mol Nukleotid. Amplituden aufgetragen gegen r -Werte, die aus der Bindungsisotherme nach dem Trial und Error-Verfahren gewonnen wurden (s. Tab. V)

Als kooperativen Effekt definieren wir hier und im Folgenden einen Effekt auf die Wechselwirkung des Antibiotikums mit der DNA (Affinität), der durch die Anwesenheit anderer gebundener Antibiotika-Moleküle hervorgerufen wird. Die Definition entspricht dem üblichen Verständnis ^{des} Begriffes wie es etwa am Beispiel der Affinität des Hämoglobin-Moleküls für Sauerstoff erläutert wird. Ein kooperativer Effekt liegt zum Beispiel dann vor, wenn die durch die Bindung eines Antibiotika-Moleküls hervorgerufene spezifische Änderung der Amplitude des CD-Spektrums an einer bestimmten Wellenlänge nicht unabhängig

vom r-Wert ist, also wenn $\partial \Delta \epsilon(\lambda) / \partial r \neq \text{const}(\lambda)$ gilt. Ein kooperativer Effekt ist nachweisbar in einer Darstellung der Meßdaten nach dem Muster der Abb. 47 als eine Abweichung der die Meßpunkte verbindenden Kurve von der Linearität.

3.2.5 Bindung von Chromomycin und Mithramycin an DNA. CD-Untersuchungen im fernen UV-Bereich

Fragestellung: Die Experimente mit Chromomycin und Mithramycin im fernen UV-Bereich wurden durchgeführt, um in einer vergleichenden Studie zu Nogalamycin und Daunomycin, Proflavin und Ethidium-Bromid nach Hinweisen auf den modus der Bindung zu suchen. Insbesondere war gefragt, ob sich aus zirkulardichrographischen Kriterien Evidenz für einen intercalativen Bindungstyp einiger dieser Antibiotika erhalten läßt.

3.2.5.1 Chromomycin

Wie für Nogalamycin und Daunomycin wurden auch für Chromomycin und Mithramycin Probenreihen mit Antibiotikum und DNA in variablen Konzentrationsverhältnissen durchgemessen. Dabei war in allen Proben die Antibiotika-Konzentration dieselbe und nur die DNA-Konzentration variierte. Wir arbeiteten in einem Bereich der D/P-Werte von 0.018 bis 0.366. Weitere experimentelle Einzelheiten sind in den Legenden zu Abb. 48 aufgeführt. Einige CD-Spektren aus diesen Meßreihen sind in Abb. 48 a) angegeben, einige Differenz-Spektren nach Abzug des entsprechenden Spektrums freier DNA in Abb. 48 b).

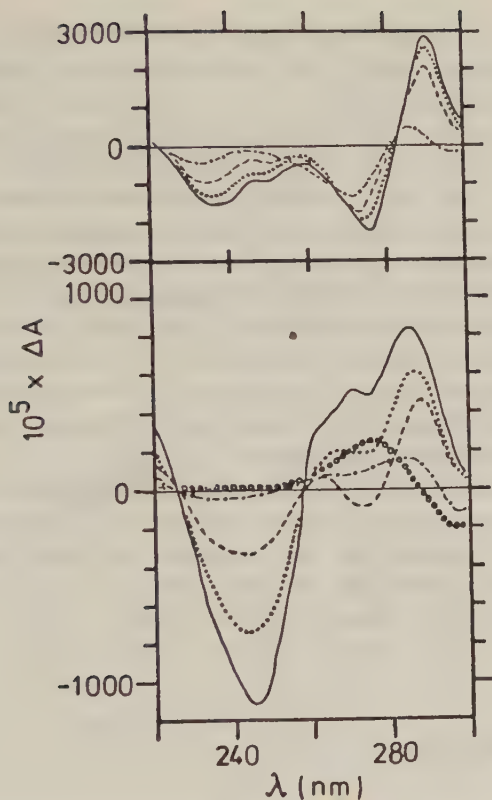


Abb. 48 a)

Gesamt-CD-Spektren der Komplexe von Mithramycin (oben) und Chromomycin A3 (unten) mit Kalbs-Thymus DNA im fernen UV. In allen Chromomycin-Proben 6.4×10^{-5} M Antibiotikum, in allen Mithramycin-Proben 5.8×10^{-5} M Antibiotikums. Überall Mg^{2+} in der doppelten Konzentration des Antibiotikums. Na_2HPO_4 - Puffer 10 mM., pH 7.01 bei 20°C . Mithramycin: (—): D/P = 0.0165., $C_P = 3.5$ mM.,

(.....): $D/P = 0.0232.$, $C_P = 2.5 \text{ mM.}$, (-----): $D/P = 0.0332.$, $C_P = 1.75 \text{ mM.}$, (-o-o-): $D/P = .$, $C_P = 0.$, Chromomycin: (-----): $D/P = 0.0183.$, $C_P = 3.5 \text{ mM.}$, (.....): $D/P = 0.0277.$, $C_P = 2.31 \text{ mM.}$, (-----): $D/P = 0.0555.$, $C_P = 1.155 \text{ mM.}$, (-o-o-): $D/P = 0.366.$, $C_P = 0.175 \text{ mM.}$, (oooooo): freies Antibiotikum ohne DNA., Die D/P -Werte sind eine obere Grenzabschätzung des Bindungsparameters r . Für $D/P \leq 0.1$ gilt: $D/P \approx r$.

Die DNA wurde auf Doppelsträngigkeit geprüft durch Aufnahme eines Schmelzprofils. Das Profil war symmetrisch bezüglich des Schmelzpunktes $T_m = 76^\circ\text{C}$. Mit einem Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge wurde darüber hinaus gesichert, daß das Material hochmolekular war und paucidispers.

Die Ordinatenwerte sind angegeben für eine Küvettenschichtdicke von 1 cm. Die Def. von ΔA ist in der Legende zu Abb. 45 angegeben. Die Spektren der freien Antibiotika sind zu vergleichen mit Abb. 23. Eine Abbildung eines Originalspektrums ist in Abb. 10 zu finden.

3.2.5.2 Mithramycin

Die Gesamtspektren einiger Proben aus der Meßreihe mit Mithramycin und Kalbsthymus DNA sind in Abb. 48 a) angegeben, die Differenzspektren in Abb. 48 b).

Gleichgewichtsdialyse

Zur Ermittlung der exakten r -Werte in unseren Komplexproben wurde ein Gleichgewichtsdialyse-Experiment angesetzt. Das Verfahren hierzu wurde bereits für die Untersuchung der Bindung von Daunomycin an DNA beschrieben. Das Experiment mußte aus zwei Gründen nach 48 Stunden ab-

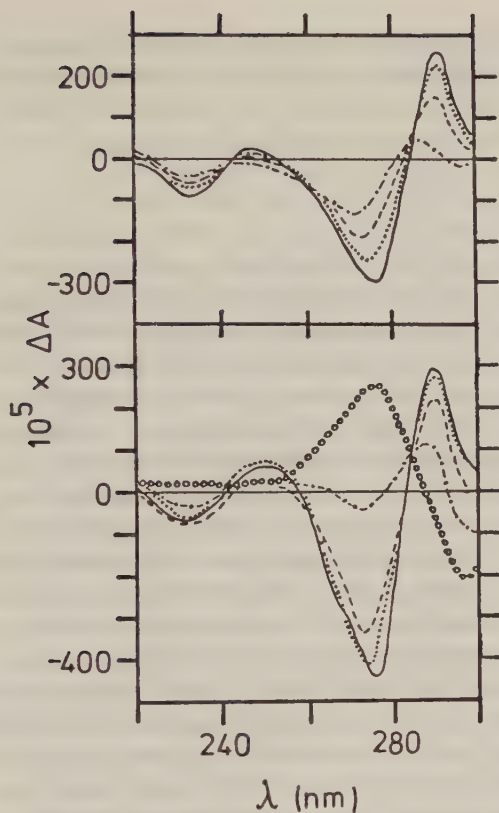


Abb. 48 b)

Differenz Spektren der Proben mit Mithramycin (oben) und Chromomycin A 3 (unten).

Mithramycin: (-o-o-): freies Antibiotikum., die anderen Symbole wie in Abb. 48 a)

Chromomycin: (ooooo): freies Antibiotikum., (—):

D/P = 0.0183., (ooooo): D/P = 0.0555., (-o-o-): D/P = 0.219.,

Der isoelliptische Punkt bei 280 nm deutet an, daß das Anti-

biotikum bei niedrigen r-Werten nur in zwei Zuständen vorliegen kann: als freies Antibiotikum oder gebunden in einem einzigen möglichen Bindungstyp. Dieser Befund wird später durch die Matrix-Rang-Analyse bestätigt.

gebrochen werden: a) In dieser Zeit war von einer Probe, die in der einen Zellhälfte nur Antibiotikum und in der anderen Hälfte ausgangs nur Puffer enthielt, erst ca. $\frac{1}{3}$ des Antibiotikums transportiert worden. b) Es war in diesem Fall schwieriger, den Antibiotika-Gehalt in der Zellhälfte mit DNA zu bestimmen als im Falle des Daunomycin. Hier präzipitiert bei der Alkoholfällung das Antibiotikum mit der DNA anstatt sich abzulösen. Auch durch eine DNase Behandlung war das Antibiotikum nicht abzulösen. Die Chromomycine und Mithramycine hatten sich schließlich auch schon bei anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe als besonders schwierige Objekte für Gleichgewichtsdialyse-Experimente erwiesen, da sie an Zellen und Membranen in schlecht reproduzierbaren und damit nicht korrigierbaren Mengen haften bleiben. Unsere Versuche, die Bindungsisotherme spektrophotometrisch nach PEACOCKE und SKERRETT (1956) zu ermitteln, schlugen fehl, da die Absorptionsspektren unserer Proben nicht alle durch einen isosbestischen Punkt liefen. Zwar haben BEHR und HARTMANN (1965) einen isosbestischen Punkt für Chromomycin-DNA-Spektren gefunden, jedoch nur in einem kleineren Intervall von r-Werten als dem hier benützten. Es ist nicht auszuschließen, daß unsere Absorptionsspektren einer uns unbekannten Korrektur bedürfen, die bei den von HARTMANN et al. publizierten Spektren bereits durchgeführt ist oder deren Notwendigkeit dort gar nicht aufgetreten ist. Bis jetzt verfügen wir nicht über eine gute Bindungsisotherme für Chromomycin und Mithramycin.

3.2.6 Zusammenfassende Beschreibung der Resultate der Bindungsstudien mit den vier Antibiotika im fernen UV-Bereich.

3.2.6.1 Gesamtspektren der Komplexe

Betrachten wir zunächst die Abbildungen 45 a) und 48 a). Bei niedrigen r -Werten zeigen die Spektren der Daunomycin-Komplexe, daß die Grundgestalt des DNA-CD-Spektrums durch die Wechselwirkung mit dem Antibiotikum nur wenig modifiziert ist. Bei höheren r -Werten zeigen sich Abweichungen davon im negativen Extremum (Abb. 45 a). Mit allen drei anderen Antibiotika finden wir bei Bindung an DNA bereits von niedrigen r -Werten an stärkere Abweichungen in der Gestalt des Komplex-CD-Spektrums vom Grundspektrum freier DNA. Bei niedrigen r -Werten liegt die DNA in sehr hohem Überschuß vor. Die Spektren der freien Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen weisen vergleichsweise dazu nur kleine Amplituden auf. Durch bloße Überlagerung mit dem DNA-Spektrum können dadurch nicht die beobachteten Spektren der Komplexe erzeugt werden. Dies wird besonders klar an den Spektren der Mithramycin-DNA-Komplexe (Abb. 48 a). Die Spektren der freien Antibiotika in den konstanten Konzentrationen, in denen sie in den Proben vorlagen, sind in Abb. 45 a) und 48 a) eingezeichnet.

Nogalamycin verursacht eine Zunahme der Intensität der positiven Bande des DNA-CD-Spektrums und eine Abnahme der negativen Bande bei ca. 250 nm, die in einem Vorzeichenwechsel bei dieser Wellenlänge gipfelt und im Erscheinen eines neuen positiven Extremums bei 240 nm.

Chromomycin verursacht im Gegensatz dazu beträchtliche Veränderungen im Bereich der positiven Bande des DNA-CD-Spektrums (260 bis 300 nm), während hier das negative Extremum bei 260 nm relativ unbeeinträchtigt bleibt.

Mithramycin verursacht das Auftreten eines völlig neuen Doublets mit einem positiven Maximum bei 290 nm und einem Mini-

mum bei 275 nm. Bei 235 nm ist noch eine signifikante negative Bande festzustellen.

3.2.6.2 Differenz-Spektren der Komplexe

Die Gesamtsumme der Veränderungen in den CD-Spektren von DNA und Antibiotika, welche durch die Wechselwirkung hervorgerufen werden, kann erfaßt werden. Dazu wird vom CD-Spektrum des Komplexes das CD-Spektrum abgezogen, welches die in der Komplexprobe enthaltene DNA-Konzentration im freien Zustand erzeugen würde. Das verbleibende Differenzspektrum ist mit den Spektren des freien Antibiotikums und der freien DNA zu vergleichen. Dieses Verfahren liefert nicht etwa das CD-Spektrum des gebundenen Antibiotikums allein, wie vielfach fälschlich behauptet wird. Vielmehr ist das Differenzspektrum noch zusammengesetzt aus den CD-Beiträgen von freiem Antibiotikum (wenn noch vorhanden - das ist meist nur bei hohen r -Werten der Fall), gebundenem Antibiotikum und eventuellen Änderungen im CD-Spektrum der DNA, die durch die Komplex-Bildung verursacht wurden. Solche Veränderungen können entweder durch Konformationsänderungen der DNA oder durch elektronische Wechselwirkung der DNA-Basen mit den Farbstoff-Chromophoren entstehen. Diese verschiedenen Beiträge sind aus einem Differenzspektrum nicht ohne weiteres quantitativ separierbar. Allenfalls könnte man nach Maßgabe der r -Werte der Komplexproben (erhältlich aus Bindungsisothermen) das entsprechende Spektrum freien Antibiotikums abziehen. Dies ist eine i. a. sehr kleine Korrektur. Dann aber bleiben immer noch die Summe der Beiträge von gebundenem Farbstoff und von DNA-Spektraländerungen übrig, deren relative Anteile wiederum nicht quantitativ anzugeben sind. Immerhin erfaßt diese Methode alle durch die Komplexbildung erzeugten Veränderungen, und bringt uns damit in der Aufar-

beitung der Rohdaten wenigstens um einen Schritt weiter. Dieser Schritt kann, wie im Folgenden gezeigt, bereits wertvolle zusätzliche Hinweise für die Interpretation der Ergebnisse liefern. Die in Abb. 45 b) und 48 b) gezeigten Differenzspektren sind auf die oben beschriebene Weise erhalten worden.

Die Differenzspektren von Mithramycin und Chromomycin sind von ganz ähnlicher Natur, obwohl die Brutto-Spektren der Komplexe zunächst recht verschieden aussahen. Diese Differenzspektren enthalten eine positive Bande bei 288 nm und eine negative bei 283 nm. Obwohl die UV-Bereiche der CD-Spektren dieser beiden Antibiotika im freien Zustand bei verschiedenen Chargen beträchtliche Differenzen aufweisen (vgl. Abb. 23 u. Abb. 48 a), sind die Differenz-CD-Spektren der DNA-Komplexe quantitativ und qualitativ so ähnlich, daß die Bindungspositionen beider Antibiotika sehr ähnlich sein müssen, wenn nicht identisch. Zu demselben Schluß waren wir auch bereits aufgrund der großen Ähnlichkeiten der Spektren der Komplexe dieser beiden Antibiotika mit DNA im sichtbaren Spektralbereich gelangt. Dies impliziert, daß durch die Komplexbildung ziemlich starke gleichartige Zwangsbedingungen an die Konformation beider Liganden auferlegt werden im Vergleich zu ihren (nach Maßgabe der unterschiedlichen CD-Spektren im UV-Bereich) unterschiedlichen Konformationsmöglichkeiten im freien Zustand. Dieser Befund spricht für einen spezifischen Bindungsort an der DNA eher denn für einen unspezifischen Anlagerungstyp. Angesichts dieser Konklusionen ist es überraschend, daß WARING (1970) unterschiedliche hydrodynamische Eigenschaften für kreisförmig geschlossene DNA findet, wenn diese beiden Antibiotika an sie gebunden sind. Die CD-Spektren der Komplexe deuten darauf hin, daß die optische Aktivität der gebundenen Antibiotika-Moleküle nur durch die Zwangsbedingungen an die Konformation bestimmt ist, die die DNA ihren Chromophoren

auferlegt. Diese überspielen die Zwangsbedingungen durch die Zuckerseitenketten, die im freien Zustand für die Konfiguration der Chromophore determinierend sind.

Bei Chromomycin ist im Doublett bei 290 nm ein Vorzeichenwechsel vom freien zum gebundenen Zustand (Differenzspektrum) aufgetreten. Bei den in Abb. 48 b) benützten Mithramycin-Chargen hatte dieses Doublett bereits im "freien" Zustand die Vorzeichenfolge, die es auch im gebundenen Zustand noch hat. (Umgekehrte Folge wie beim freien Chromomycin, im Gegensatz zu der von Abb. 23 bis Abb. 36 benutzten Mithramycin-Charge.)

Das Doublett kehrte früher sein Vorzeichen bei Komplexbildung mit Co^{2+} und DNA um, zu derselben Vorzeichenfolge, die es jetzt im CD-Differenzspektrum des DNA-Mg^{2+} -Komplexes einnimmt. Daraus ist zu schließen, daß beide zu den Studien im fernen UV-Bereich benützten Mithramycin-Chargen nicht denselben Reinheitsgrad besaßen wie die früher benutzte Charge. Unabhängig von eventuellen Verunreinigungen oder Zerfallerscheinungen aber ist das Spektrum des an DNA gebundenen Mithramycins für alle benützten Chargen dasselbe. Dies unterstützt unsere Interpretation, daß die Konformation der gebundenen Chromomycin-Antibiotika eindeutig durch die DNA determiniert wird. Es ist nicht auszuschließen, daß die hydrodynamischen Daten der Arbeit von WARING (1970) sehr sensibel auf eine eventuelle starke Verunreinigung der Mithramycin-Charge reagierten und Unterschiede im DNA Bindungsmodus vorgetäuscht wurden. Ein Versuch zu einer Interpretation dieser Vorzeichenumkehr wird im folgenden Abschnitt (Diskussion) unternommen.

Daunomycin und Nogalamycin zeigen in den Differenzspektren (Abb. 45) sowohl voneinander als auch von Chromomycin und Mithramycin abweichendes Verhalten. Die CD-Differenzspektren zeigen einen Hauptbeitrag (243 nm bei Nogalamycin, 250 nm bei Daunomycin), der schon bei sehr niedrigen

r-Werten auftritt und bei weiterer Variation von r fast konstant bleibt. Es finden also nur geringe kooperative Strukturveränderungen in der DNA statt, wenn diese Antibiotika mit ihr wechselwirken. Die CD-Spektren der freien Antibiotika sehen sich ähnlich in der Lage ihrer Maxima (235 nm und 255 nm), Minima (240 nm und 290 nm) und Achsenschnittpunkte (270 nm), unterscheiden sich aber in den relativen Intensitäten ihrer optisch aktiven Übergänge. Das bedeutet, daß die beiden Zuckerreste am Nogalamycin einen anderen sterischen Effekt auf den Chromophor ausüben als der eine Zuckerrest im Daunomycin, obwohl die Substitutionsposition dieses Zuckerrestes am Chromophor in beiden Antibiotika dieselbe ist. (Abb. 1 oder Abb. 38 und 41). Die Beobachtung, daß die Differenz-CD-Spektren der Komplexe dieser Antibiotika qualitativ und quantitativ voneinander abweichen, kann als Hinweis darauf angesehen werden, daß Daunomycin und Nogalamycin nicht in derselben Weise an DNA binden. (Ordinaten in Abb. 45 b) oben und unten um Faktor 2 verschieden). Die Differenzspektren zeigen an, daß diese Antibiotika entweder die DNA-Struktur auf unterschiedliche Weise verändern, oder, daß sie in unterschiedlichen Bindungspositionen mit unterschiedlicher kooperativer Wechselwirkung bzw. Wechselwirkung mit den DNA-Basen binden - oder beides.

3.2.6.3 Matrix-Rang-Analysen

Eine Matrix-Rang-Analyse der Spektren aus Abb. 45 a) und 48 a) in einer für unsere Zwecke modifizierten Version der Methode nach McMULLEN et. al., (1967) wurde durchgeführt. Das Ziel einer solchen Analyse ist es, aus einem vorgefundenen Satz von Spektren von einem Gemisch aus mehreren Komponenten herauszufinden, wieviele unabhängige Komponenten

beteiligt sind. Es soll z. B. herausgefunden werden, ob zu einem Satz gemessener Mithramycin-DNA-Komplexspektren etwa nur drei Komponenten (freies Mithram., freie DNA., Komplex) beitragen, oder vier (z. B. freies Mithramycin, freie DNA., Komplex I = DNA + gebundenes Mithramcin-Monomer., Komplex II = DNA + gebundenes Mithramycin-Dimer) oder fünf etc.

In der Analyse werden Spektren derselben Komplexe bei unterschiedlichen relativen Konzentrationen der Partner als Zeilen einer Matrix geschrieben. Die Amplitudenwerte an diskreten Wellenlängen werden als Platzelemente in die Matrix eingetragen. Beispiel:

Ampl. (Spektr. No. 1)	0.4	0.5	0.6	0.5	0.4	...
Ampl. (Spektr. No. 2)	0.6	0.8	1.0	0.8	0.4	...
etc.	.	.	.	.	.	.
etc.	.	.	.	.	.	.
Wellenlänge (nm)	220	225	230	235	240	...

Mit einem Computerprogramm wird der Rang dieser Matrix ermittelt, welcher gleich der Anzahl der linear unabhängigen Grundspektren ist, aus denen die Spektren der Komplexe kombiniert sind. Der Rang ist dann gleich der gesuchten Anzahl der Komponenten. Das Ergebnis unserer Matrix-Rang-Analyse ist in Tabelle VI aufgeführt.

Für jeden Satz von Spektren wurden zwei Analysen durchgeführt. Die erste an der Matrix der gemessenen Spektren, die zweite an der um das CD-Spektrum der freien DNA erweiterten Matrix. Der Rang beider Matrizen sollte derselbe sein, wenn die DNA einen relativ konstanten spektralen Beitrag zu den Spektren der Komplexe liefert, d. h. wenn durch die Komplex-

Tabelle VI

Matrix Rang Analyse

Ligand	Rang der Grundmatrix	Rang der um DNA erweiterten Matrix
Daunomycin	4	4
Nogalamycin	3-4	3-4
Chromomycin	3	3
Mithramycin	3	3
9-Amino Acridin	2	3

bildung die Grundkonformation der freien DNA nur geringfügig modifiziert wird. Die Methode der Differenzspektren ist demzufolge genau dann zu rechtfertigen, wenn der Rang beider Matrizen gleich ist, sonst nicht. Wir fanden, daß in allen unseren Sätzen von Brutto-Komplexspektren die Ränge beider Matrizen gleich waren, die Differenzbildung also überall gerechtfertigt war.

Für Daunomycin wurde die Anzahl der unabhängigen Komponenten mit vier gefunden, für Nogalamycin 3 bis 4, für Chromo- und Mithramycin 3 und für 9-Aminoacridin mit 2. Die Zahl 2 bedeutet in diesem Fall: im untersuchten Bereich der relativen Konzentrationen, der vergleichbar zu den für die anderen Antibiotika-DNA-Komplexen gewählt wurde, (Messungen von D.G. DALGLEISH), liegt nur gebundenes Antibiotikum in einem Bindungstyp vor und DNA, die in ihrer Struktur gegenüber freier DNA erheblich durch die Bindung modifiziert ist. Bei Erweiterung der Matrix um das Spektrum der freien DNA erhöht sich der Rang eindeutig auf 3.

Die Zahl 4 für Daunomycin war zunächst schwierig zu verstehen wegen der nur schwachen Variation der Amplituden der CD-Differenzspektren mit r . Bei genauerer Analyse wurde dann die bereits bei der Diskussion der Abb. 47 erwähnte geringe kooperative Variation der Amplitude bei 250 nm mit r gefunden. Diese erklärt die durch die Matrixrang-Analyse geforderte vierte unabhängige Spektralkomponente. Es handelt sich dabei entweder um in einem zweiten Bindungsmode gebundene Daunomycin-Moleküle oder wahrscheinlicher um bei höheren r -Werten einsetzende kooperative Wechselwirkung benachbart gebundener Chromophore.

3.2.7 Diskussion der Ergebnisse mit Chromomycin, Mithramycin, Daunomycin, Nogalamycin und DNA im fernen UV.

Die Intercalation von Molekülen zwischen die Basenpaare von DNA resultiert in einer Änderung der Konformation der Nukleinsäure (FULLER, 1966., LERMANN, 1961). Diese Änderung wird angezeigt durch eine Modifikation im CD-Spektrum der DNA. Aufgabe dieser Untersuchung war es, zu zeigen ob solche Modifikationen für die vier Chromoglykosid-Antibiotika eintreten. Das resultierende Gesamtbild aus der abgeschlossenen Untersuchung ist kompliziert durch die Absorptionsbanden dieser Antibiotika im fernen UV, die zu CD-Spektren sowohl für das freie als auch für das gebundene Antibiotikum Anlaß geben. In diesem Punkt sind Untersuchungen an flachen Farbstoffmolekülen ohne CD-Spektren im freien Zustand (Aminoacridine, Ethidium Bromid) weniger verwirrend und vergleichsweise "leichter" interpretierbar.

Alle vier Antibiotika zeigen einige Änderungen im CD-Spektrum als Resultat ihrer Wechselwirkungen mit DNA. Die Spektren von Chromomycin zeigen, daß der Bindungsort (und Bindungsmodus) für dieses Antibiotikum sehr ähnlich sein muß zu

dem für Mithramycin. Die Geometrie der DNA determiniert die Konformation der gebundenen Antibiotika und definiert damit dominant die Gestalt der CD-Spektren des Komplexes. Die in der Matrix-Rang-Analyse gefundenen drei Komponenten zeigen, daß nur freies Antibiotikum, unveränderte DNA und nur ein Typ von Antibiotika-DNA-Komplex vorliegt. Es treten keine kooperativen Struktureffekte auf die DNA ein als Resultat der Antibiotika-Bindung. Wir können noch nicht sagen, ob die beobachteten CD-Spektren der Komplexe Resultat eines interkalativen Bindungsmodus sind, oder welcher Art ein anderer Bindungsmodus sein müßte, der für die Gestalt dieser Spektren verantwortlich ist.

Daunomycin zeigt eine gewisse geringe kooperative Variation seines CD-Spektrums als Funktion von r . Dies wird gezeigt durch die Variation des Gipfels bei 250 nm in den Differenz-Spektren und durch das Resultat der Matrix-Rang-Analyse. Über die Beiträge von freiem Antibiotikum und von unveränderter DNA hinaus liegt hier Evidenz vor für die Existenz von zwei Typen von Antibiotika-DNA-Komplexen.

Nogalamycin gibt keine so klare Evidenz für vier Komponenten, aber durch das Resultat der Matrix-Rang-Analyse werden sie angezeigt.

Diese Resultate sollte man im Vergleich sehen zu den Resultaten für 9 - Aminoacridin (Abb. 66), welches intercaliert (DRUMMOND et al., 1966). Untersuchungen an dieser Substanz und einigen substituierten Derivaten (DALGLEISH et al., 1971 ., DALGLEISH et al. in press) sind durchgeführt worden. Die Resultate für diese Substanzen zeigen andere Charakteristika als die Resultate der hier untersuchten Antibiotika. Für 9-Aminoacridin wird ein Differenz-CD-Spektrum gefunden, welches im UV-Bereich stark mit r variiert. Ähnliche Resultate liegen vor für Proflavin-DNA-Komplexe (DALGLEISH et al., 1971., DALGLEISH und DINGSOYR, in Vorbereitung). Keines der hier untersuchten Antibiotika ver-

hält sich genauso wie die kleineren interkalierenden Moleküle, denen Zuckerseitenketten und andere sperrige Substituenten fehlen. Wenn die hier untersuchten Substanzen interkalieren sollten, dann tun sie es nach Aussage unserer Befunde nicht in der gleichen Weise wie die Aminoacridine. Sie könnten partiell interkalieren, wobei nur ein Teil des Chromophors zwischen die Basenpaare ragt. Ein solcher Bindungstyp würde andere Effekte auf die Struktur der DNA hervorrufen als die vollständige Interkalation der Aminoacridine, und dies könnte auch die beobachtete relative Geringfügigkeit der kooperativen Effekte bei der Bindung von Daunomycin erklären.

Die Aminoacridine erhöhen die Viskosität der DNA. Der Anstieg verläuft nicht in linearer Abhängigkeit von r (DRUMMOND et al., 1966). Nach unserer Definition der kooperativen Effekte ist dieser Befund als ein kooperativer Effekt auf die Struktur der Nukleinsäure als Resultat der Interkalation anzusehen. Die ersten intercalierenden Moleküle haben einen stärkeren Effekt auf die Struktur der DNA als die nachfolgend interkalierenden. Damit wird die starke Variation der für Proflavin und 9-Aminoacridin beobachteten CD-Differenzspektren mit r erklärt.

Für interkalierende Moleküle müßte man daher in Analogie generell einen gewissen Grad an Kooperativität in der Variation der Amplituden der CD-Differenzspektren mit r erwarten.

Das erwartete Verhalten wird für Daunomycin gefunden, für Nogalamycin nicht so klar und für Chromomycin und Mithramycin gar nicht. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß Daunomycin intercaliert. Dieser Schluß wird ferner unterstützt durch die Beobachtung, daß die Daunomycin-Differenzspektren für hohes und für niedriges r am stärksten voneinander

an den Wellenlängen 250 und 275 nm abweichen, wo sich auch die erwarteten Änderungen des CD-Spektrums der DNA am stärksten niederschlagen müßten. Der Schluß ist in Übereinstimmung mit den Resultaten der Untersuchungen anderer Autoren gezogen (KERSTEN et al., 1966., WARING, 1970., PIGRAM et al., 1972).

Unsere Untersuchungen liefern jedoch keine direkten Beweise für Intercalation. Die gesamte CD-Spektroskopie kann auf dem gegenwärtigen Stand unserer theoretischen Kenntnisse keine direkten Beweise dafür liefern. Wir könnten uns nämlich durchaus vorstellen, daß andere, nicht intercalative Bindungstypen dieselben CD-Befunde hervorriefen. Solange wir nicht mittels einer (selbst wieder experimentell gesicherten) Theorie in der Lage sind, solche andern Möglichkeiten auszuschließen, bleibt die Situation der Beweisbarkeit unverändert. Mithramycin und Chromomycin zeigen keine Evidenz für Intercalation. Welche Bindungstypen hier zu den erhobenen CD-Befunden führen könnten, können wir aus den genannten Gründen nicht positiv sagen.

Nogalamycin ruft ähnliche hydrodynamische Effekte hervor wie intercalierende Moleküle, zeigt aber spektroskopische Effekte, die mehr denen für nicht intercalierende Moleküle ähneln. WARING (1970) fand in Nogalamycin einen noch typischeren Interkalanten als Daunomycin aufgrund seiner Effekte auf intern verdrehte ("supercoiled") DNA. Wir können daher aus diesen beiden gegenläufigen Konklusionen noch keinen endgültigen Schluß ziehen. Es wäre sinnvoll, hier einige kinetische Messungen vorzunehmen, da Nogalamycin mit einem Zuckerrest an jedem Ende des Anthrazyklinringes größere Schwierigkeiten haben sollte zu intercalieren, als Daunomycin. Daunomycin sollte mit beiden Enden des Ringsystems ohne große sterische Behinderung zwischen die Basenpaare der DNA eindringen können.

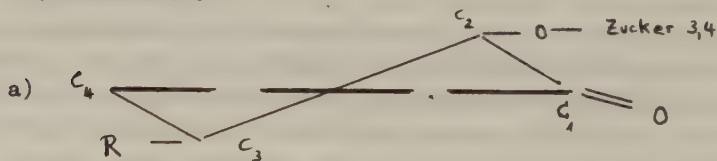
3.2.7.1 Vorzeichenumkehr des Chromomycin-Doubletts bei 280 nm

In den Differenzspektren des Chromomycin-Mg-DNA-Komplexes (Abb. 48 b)) hatten wir eine Vorzeichenumkehr des Doubletts bei 280 nm festgestellt, welche den Übergang vom freien zum Komplex-gebundenen Antibiotikum begleitet. Nach den Erläuterungen im Abschnitt "Meßgrößen und Information" (Abb. 5) bedeutet eine Vorzeichenumkehr in einer CD-Bande i. A. eine signifikante Konformationsänderung des Chromophors. Wenn dabei die Rotatorstärke unter der Bande annähernd gleich bleibt, was hier der Fall ist, bedeutet die Vorzeichenumkehr meistens (aber nicht notwendig !) eine bloße Änderung der Orientation der Übergangsdipolmomente zueinander bei gleichbleibenden Beträgen:

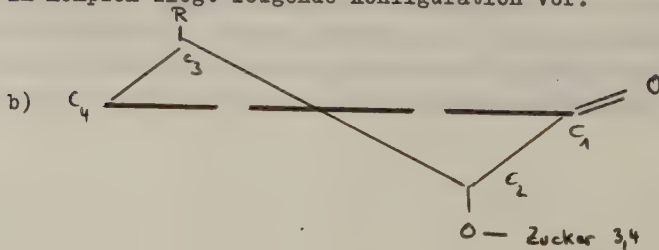
$$\vec{m}_{el} \cdot \vec{\mu}_{mag} = \| m_{el} \| \cdot \| \mu_{mag} \| \cdot \cos \varphi \quad (\vec{m}_{el}, \vec{\mu}_{mag})$$

$$\| \vec{m}_{el} \|, \| \vec{\mu}_{mag} \| = \text{const} \quad \cos \varphi = -\cos (180 \pm \varphi)$$

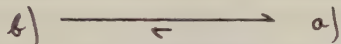
Folgende Modellvorstellung könnte den Befund erklären (SNATZKE, 1969). Für das freie Antibiotikum gilt folgende Konformation des A-Ringes des Chromophors bezüglich der Ebene der flachen, aromatischen B- und C-Ringe, die die Papierebene orthogonal in der Schnittlinie durch C 1 und C 4 durchsetzt:



Im Komplex liegt folgende Konfiguration vor:



Beide Konformationszustände sind bereits für das freie Antibiotikum möglich, aber a) ist energetisch stark begünstigt:



Im Komplex jedoch behindert die DNA die Seitenkette in Konfiguration a) , so daß b) bevorzugt wird. Auch könnten die Zuckerseitenketten bei der Bindung an DNA am C-2 einen Zug ausüben, wodurch der Konformationsübergang ausgelöst wird. Bei diesem Umlappen des A-Ringes aus der a) - in die b) -Konformation bleiben die Absolutbeträge der elektrischen und magnetischen Übergangsdipolmomente konstant und ihre Winkel ändern sich in der Weise, daß gerade das Vorzeichen des Skalarprodukts umgekehrt wird.

Diese Verschiebung des Konformationsgleichgewichtes sollte das UV-Absorptionsspektrum nicht wesentlich beeinflussen. In der Tat wird gefunden, daß die Assoziation von Chromomycin an DNA die Absorptionsbande bei 290 nm nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 23). Daher wird man die beiden Doubletts des Chromomycin CD-Spektrums bei 405 nm und bei ca. 280 bis 290 nm möglicherweise elektronisch entkoppelten Chromophoren zuschreiben müssen, denn die Absorptionsbande bei 405 nm wird durch die Komplexbildung sehr wesentlich verändert.

Die Interpretation wäre demnach zusammenfassend, daß das Doublett bei 405 nm den freien Chromomycin-Dimeren in Lösung zuzuschreiben ist und sein Verschwinden der Bindung von Chromomycin-Monomeren an DNA. Das Doublett bei 290 nm könnte nach obigem Modell dem Monomer-Chromophor inhärent zukommen und seine Vorzeichenumkehr dem Konformationsübergang $\alpha \rightarrow b$ des A -Rings des Chromophors zuzuschreiben sein. Bei der Komplexbildung an DNA scheinen also nicht nur

die Zuckerseitenketten beteiligt zu sein, sondern auch die Chromophore. Die Zucker liegen relativ "weit weg" vom Chromophor, sind elektronisch nur schwach mit ihm gekoppelt und geben selbst direkt keinen nennenswerten Beitrag zum CD-Spektrum. Zu dieser Konklusion sind bereits andere Autoren gelangt (GOLDBERG und FRIEDMANN, 1971).

3.3 Zirkulardichrographische Untersuchungen an Ethidium-Bromid-DNA-Komplexen

3.3.1 Problemstellung:

Zirkulardichrographische Untersuchungen mit DNA und Ethidium-Bromid (EBr) wurden durchgeführt, da dieser Farbstoff nach den Untersuchungen von FULLER und WARING (1964) und WARING (1965) als Modell einer intercalativ an DNA bindenden Substanz gelten kann. Da ein direkter Beweis für Intercalation bisher nicht existiert, wird der Bindungsmodus anderer zu untersuchender DNA-Liganden oft durch Vergleich ihrer Eigenschaften mit denen des EBr-DNA-Komplexes beurteilt. Dabei wird das Urteil gefällt nach Abwägung einer Reihe von Kriterien, die jedes für sich genommen die Intercalation nicht spezifisch beweisen, alle zusammen genommen jedoch einen starken Hinweis darauf liefern können. Es ist daher von Interesse nach zusätzlichen unabhängigen Kriterien zu suchen, um in kritischen Fällen die Beurteilung erleichtern oder absichern zu können. Wir wollten daher untersuchen, ob wir aus den CD-Spektren (im sichtbaren und im ultravioletten Spektralbereich) des EBr-DNA-Komplexes ein neues Kriterium für Intercalation ableiten könnten.

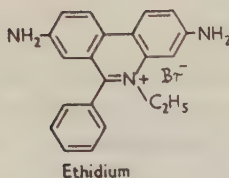


Abb. 49

3.3.2 Resultate

3.3.2.1 Bindungsisotherme mit verschiedenen DNA-Spezies

Ethidium-Bromid (Abb. 49) ist ein flaches Molekül, das im freien Zustand im Unterschied zu den bisher behandelten Antibiotika keinen permanenten Zirkulardichroismus zeigt. Das Absorptionsspektrum von EBr weist im Sichtbaren eine Bande bei 480 nm auf, die bei der Assoziation des Farbstoffes an DNA nach 516 nm verschoben wird, wobei ein isosbestischer Punkt zu beobachten ist. Daher konnten wir diese Bande zur spektrophotometrischen Bestimmung der Bindungsisotherme nach PEACOCKE und SKERRETT (1956) ausnutzen. Die so ermittelte Bindungsisotherme ist in Abb. 50 angegeben. Sie weist eine ähnliche Form auf wie die in Abb. 46 für Daunomycin gezeigte. Das Abknicken zum Plateau tritt hier jedoch bei höheren r -Werten auf als bei Daunomycin. Während dort in Sättigung des ersten Bindungstyps maximal ein Antibiotika-Molekül pro drei Basenpaare gebunden werden konnte, kann hier bis zu ein Molekül pro zwei Basenpaare gebunden werden. Die Bindungsisothermen für die drei benützten DNA-Spezies unterschiedlichen (G+C)-Gehalts (C.johns. 33 % GC;

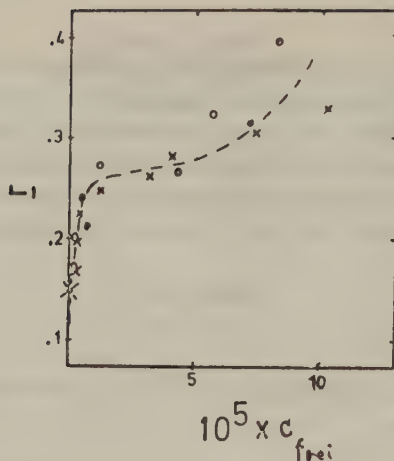


Abb. 50

Langmuir-Adsorptionsisotherme (Bindungsisotherme) für die Bindung von EBr an: (ooooo) = Kalbsthymus-DNA., (x x x) = C.johns.-DNA., (....) = S.lutea-DNA.,
 Abszisse: $10^5 \times$ Konzentration an freiem Farbstoff, c_{frei} der noch neben dem gebundenen in der Probe vorliegt.
 Ordinate: Bindungsparameter $r = c_{\text{geb}}/c_p$.

Kalbsthymus 43 % GC., S.lutea 72 % GC) sind gleich (Abb. 50).

Daraus kann der wichtige neue Schluß gezogen werden, daß es für Ethidium Bromid im quantitativen Ausmaß der Bindung keine Praeferenz für eines der beiden Basenpaare gibt.

3.3.2.2 Induzierte CD-Banden; Abhängigkeit der Intensität vom Bindungsparameter r .

Das durch Komplexbildung mit DNA induzierte CD-Spektrum zerfällt in zwei interessante Teilbereiche (Abbildungen 51

und 52). Im langwelligen Bereich ($\lambda > 300$ nm) werden Banden bei 310 nm und 340 nm induziert. An diesen Stellen liegen auch die Absorptionsbanden des Komplexes. Bei höheren Wellenlängen werden nur noch sehr schwache Banden induziert, deren Variation als Funktion von r wir nicht mehr ausmessen konnten. Im kurzwelligen Teil ist im Absorptions-Differenzspektrum eine Schulter zwischen 270 nm und 280 nm zu finden. Im CD-Spektrum wird an dieser Stelle eine positive Bande induziert (Abb. 52). Im fernen UV ist die Absorption des Farbstoffes gering - im CD-Spektrum dagegen haben wir zwei induzierte negative Banden bei ca. 250 nm und ca. 230 nm (Abb. 51, 53).

Das induzierte CD-Differenzspektrum (Abb. 53) ist im UV in seiner Gestalt sehr ähnlich dem CD-Spektrum einer freien DNA. Dieser Befund stimmt mit der naiven Erwartung überein, daß die intercalierten E Br Moleküle im Sättigungsbereich des ersten Bindungsmodus für sich betrachtet eine DNA-ähnliche Stapelstruktur und daher bei ähnlichen Elektronenübergangsmomenten im Chromophor auch ein ähnliches induziertes CD-Spektrum haben sollten.

Die Variation der induzierten Amplitude bei 310 nm mit dem Bindungsparameter r für die drei verschiedenen DNA-Spezies unterschiedlichen G+C-Gehaltes ist in Abb. 54 dargestellt.

Die beiden wichtigen Befunde aus dieser Kurve sind:

- a) die Intensität des induzierten Dichroismus variiert stark mit dem Wert des Parameters r ,
- b) die Intensität des induzierten Dichroismus ist nicht abhängig vom G+C-Gehalt der verwendeten DNA. Die Kurven für Komplexe mit allen drei DNA-Spezies sind koinzident. Die induzierte Intensität erreicht ein Sättigungsniveau für r -Werte zwischen 0.2 und 0.3 - genau in dem Bereich, in dem die Bindungsisotherme ihr Plateau erreicht. Daher kann man diesen induzierten Dichroismus den im ersten

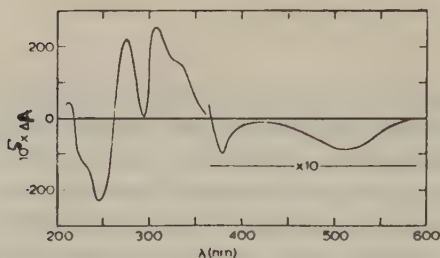


Abb. 51

Die beiden Bereiche des CD-Spektrums von E Br-Komplexen mit C.johns.-DNA. 4×10^{-2} M Tris-HCl Puffer pH 7.9., 6×10^{-4} M DNA-P., 1.33×10^{-4} M E Br., $r = 0.223$., Ordinate: gemessener Dichroismus ΔA vor Reduktion auf molekulare Größen.

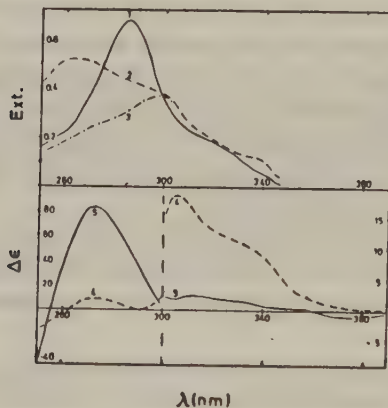


Abb. 52

oben: Veränderung des Absorptionsspektrums bei Komplexbildung. 1: freies E Br. 2: Komplex mit DNA-P/ $c_{\text{geb}} = 4.24$., 3: Differenz-Spektrum: das Absorptionsspektrum einer entsprechenden Konzentration freier DNA von Kurve 2 abgezogen.
unten: 4: induzierter Zirkulardichroismus für DNA-P/ $c_{\text{geb}} = 3.1$; 5: induzierter Dichroismus für DNA-P/ $c_{\text{geb}} = 29.2$.

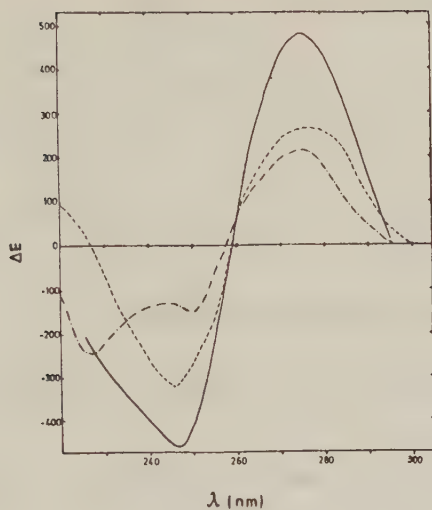


Abb. 53

--- CD-Spektrum freier DNA., ——— Komplex mit E Br.,
-.-.-.- CD-Differenzspektrum, entstanden durch Subtraktion des entsprechenden Spektrums freier DNA vom Spektrum des Komplexes.

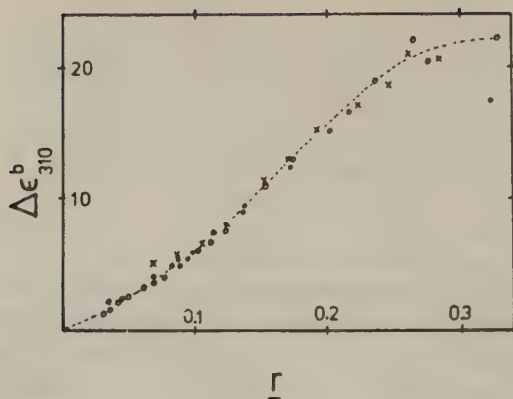


Abb. 54

Variation der induzierten CD-Amplitude bei 310 nm mit dem Bindungsparameter r für (.....) *S.lutea* DNA, (oooooo) Kalbsthymus DNA und (xxxxx) *C.johns.*-DNA.,
 Ordinate: $\Delta\epsilon_{310}^b = \Delta A / c_{\text{geb.d}}$ stellt den Beitrag der gebundenen E Br-Moleküle dar, da der Beitrag der freien Moleküle durch die Division $\Delta A / c_{\text{geb.d}}$ eliminiert wird. c_{geb} aus der Bindungsisotherme (Abb. 50)

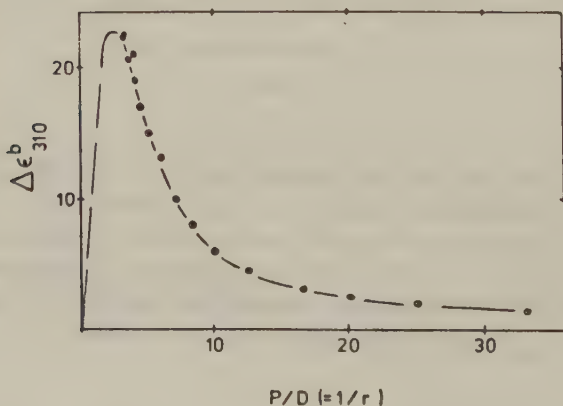
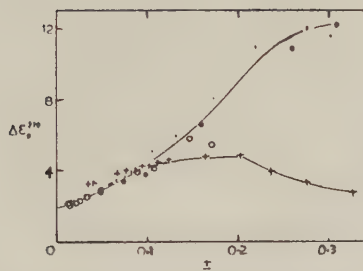


Abb. 55

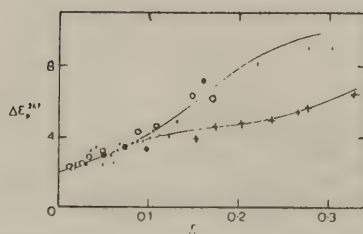
Die Bindungskurve aus Abb. 54 in inverser Darstellung (gegen $1/r$ anstatt gegen r).



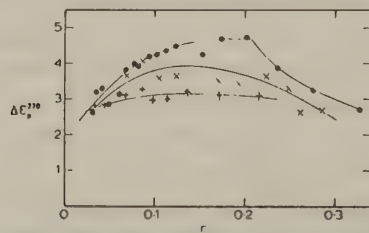
Variation with r of the positive peak in the ultraviolet CD spectra of calf thymus DNA-ligand complexes. The dichroism is expressed per mole of DNA phosphorus. O, proflavine; ●, 4-ethyl- β -aminocacridine; X, β -aminocacridine; +, ethidium bromide.

Abb. 56

Die Abbildung wurde entnommen aus unserer gemeinsamen Arbeit DALGLEISH et al. (1971)



Variation with r of the negative peak of the DNA-like doublet. Symbols as in Figure 6.



Variation with r of the positive CD peak in the ultraviolet for ethidium bromide complexed to three different DNA's. Buffer as in Figure 2. ●, calf thymus; X, *c. johnsonii*; +, *s. lutea*.

Abb. 57

Abbildung aus DALGLEISH et al. (1971)

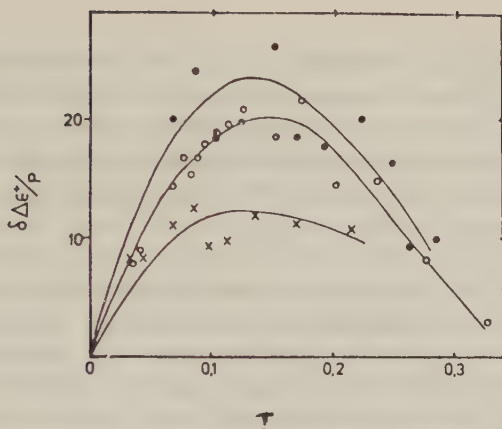


Abb. 58

Intensitätsdifferenz $\delta \Delta \epsilon^+ / P := [\Delta \epsilon^+_{\text{Komplex}} - \Delta \epsilon^+_{\text{freie DNA}}] / P$
 des Maximums der positiven Bande (270 nm) von freier DNA und
 DNA im Komplex mit E Br aufgetragen gegen $\underline{r}$, (DNA von ...
 C.johns., ooo Kalbs Thymus und xxx S.lutea) Bezogen pro
 Mol Nukleotid (DNA-P)

Bindungstyp gebundenen Molekülen zuschreiben. Trägt man
 die gleichen Meßergebnisse gegen $1/r$ auf, wie es in Abb. 55
 gezeigt ist, so sieht man klar, daß die induzierte Inten-
 sität zunimmt in dem Maße wie mehr Farbstoffmoleküle pro
 DNA-Längeneinheit gebunden werden. Man findet keine wei-
 tere Zunahme mehr sobald etwa ein Farbstoffmolekül pro 4
 Phospat-Reste, also pro zwei Basenpaare, gebunden ist
 ($r = 0.25$). Aus dieser Darstellung sieht man gut, daß die
 induzierte optische Aktivität ihren Ursprung zu einem Teil
 auch in der Wechselwirkung des Farbstoffes mit den DNA Ba-
 sen hat. Andernfalls könnte bei P/D-Werten von 20 oder höher

keine Aktivität mehr induziert werden. Zum größten Teil aber beruht die induzierte optische Aktivität auf der Wechselwirkung von im ersten Bindungsmodus (Intercalation) benachbart gebundenen Farbstoffmolekülen untereinander. Dieser Teil der induzierten Aktivität ist auch nicht als G+C- abhängig zu erwarten.

Die Analyse der positiven induzierten Bande bei ca. 270 nm zeigte keine interpretierbare G+C-Abhängigkeit. Die induzierten Aktivitäten waren am höchsten für einen mittleren G+C-Gehalt (Kalbs-Thymus-DNA), und niedriger für höheren und niedrigeren G+C-Gehalt (siehe Abb. 58). Die Abhängigkeit der induzierten Intensitäten von r zeigt bei dieser Wellenlänge einen anderen Verlauf als bei 310 (vergl. Abb. 54). Dort wurde für $r \rightarrow 0.3$ eine Sättigung erreicht, während hier zwischen $r=0.1$ und 0.2 ein Maximum erreicht wird.

3.3.2.3 Ab initio-Berechnung der CD-Spektren von DNA für verschiedene DNA-Geometrien

Wir vermuteten ursprünglich, daß die Strukturänderung der DNA bei der Komplexbildung mit zunehmendem r Wert die Ursache für den beobachteten Kurvenverlauf der induzierten Bande bei 270 nm (Abb. 58) sein könnte, da der Beitrag der DNA zum Spektrum des Gesamtkomplexes in diesem Bereich verhältnismäßig groß ist: $\Delta\epsilon_p(270)_{\text{Komplex}} \approx 4-5$; $\Delta\epsilon_p(270)_{\text{DNA}} \sim 2-3$. Eine Möglichkeit, diese Vermutung zu testen wäre, Differenz-CD-Spektren zu bilden und zu prüfen, ob der dann übrig bleibende Beitrag die gleiche Abhängigkeit von r zeigt wie die induzierte Bande bei 310 nm.

Dazu aber wäre Voraussetzung, die korrekte Differenz bilden zu können, nämlich den Beitrag der DNA in der modifizierten Konformation, die sie im Komplex einnimmt, abziehen

zu können. Wir würden damit einen anderen Typ von Differenz-Spektren als den bisher verwendeten erhalten.

Den isolierten spektralen Beitrag der durch die Komplexbildung modifizierten DNA können wir jedoch nicht direkt messen. Daher versuchten wir, ihn mit Hilfe der Theorie von JOHNSON u. TINOCO (1969) zu berechnen. Diese Theorie hatte sich als erfolgreich erwiesen, die CD-Spektren von DNA aus den elektronischen Eigenschaften ihrer Grundbausteine und aus ihrer Geometrie korrekt vorherzusagen. Daher erwarteten wir, daß sie auch leistungsfähig genug sein sollte, die CD-Spektren von DNA mit geringfügig geänderter Geometrie richtig vorherzusagen zu können, etwa mit der Geometrie der DNA in einem Intercalationskomplex. Mit den so berechneten DNA-CD-Spektren hätten wir dann die korrekten Differenz-CD-Spektren bilden und die gemessenen Spektren der Komplexe weiter analysieren können.

Wir stellten ein Algol-Programm für die Tinoco-Theorie auf und testeten es aus. Dann wurden die CD-Spektren für DNA in der Grundgeometrie, in der durch Intercalation modifizierten Geometrie und in um diese Geometrie herum variierenden Geometrien ausgerechnet. Dies geschah dadurch, daß in den Tinoco-Kalkül anstelle der normalen aus Röntgenbeugung gewonnenen Koordinaten der einzelnen Atome und Atomgruppen im DNA Molekül Koordinatenwerte eingesetzt wurden, welche der Erhöhung des Abstands der Basenpaare durch Intercalation und des gleichzeitigen Aufschraubens der DNA Rechnung trugen. Es wurden die CD-Spektren für eine Reihe von Kombinationen (Basenabstandserhöhung, Aufschraubwinkel) vorhergesagt, welche um die durch Röntgenbeugung am DNA-EB-Komplex ermittelten Werte herum streuten.

Die Theorie, die Programme und die Zwischenresultate der umfangreichen Berechnungen werden im Anhang diskutiert.

Die Endresultate dieser Berechnungen sind:

- a) Es war uns zunächst möglich das CD-Spektrum von freier DNA bis auf einen Faktor ≤ 2 genau in den Intensitäten zu berechnen (Abb. 59).
- b) Die Form des Spektrums nähert sich in befriedigender Weise der Gestalt des gemessenen Spektrums für freie DNA. Zur Berechnung wurde das Absorptionsspektrum der Nukleotide jeweils in nur zwei Gaussbanden zerlegt. Verwendet man eine genauere analytische Beschreibung (etwa die aus unserer Tabelle III), so kann die Gestalt des berechneten Spektrums die des gemessenen noch weit besser approximieren, wie wir dies früher (Abb. 22) gezeigt haben.
- c) Die Variation der berechneten Spektren mit der Geometrieänderung der DNA, die für einen Interkalationskomplex mit E Br zu erwarten ist, zeigt keine Übereinstimmung mit der Variation der gemessenen Komplex-CD-Spektren mit r . Dazu vergleiche man Abb. 58 und Abb. 60. Während wir bei den gemessenen CD-Spektren ein Maximum für die Intensitätszunahme der positiven Bande gegenüber der freien DNA zwischen $r = 0.1$ und 0.2 gefunden haben, nimmt die berechnete Amplitude gegenüber der freien DNA fast linear ab.
- d) Die Abnahme wird hervorgerufen durch die Variation der Koeffizienten A_1 und B_2 mit der Geometrie (Abb. 61, 62). Diese Koeffizienten messen (wie früher a_1 und b_2) die Beiträge der Grundkurve und der ersten Ableitung des Absorptionsspektrums eines effektiven Nukleotidmonomers in der DNA, aus denen das DNA-CD-Spektrum linear kombiniert wird.

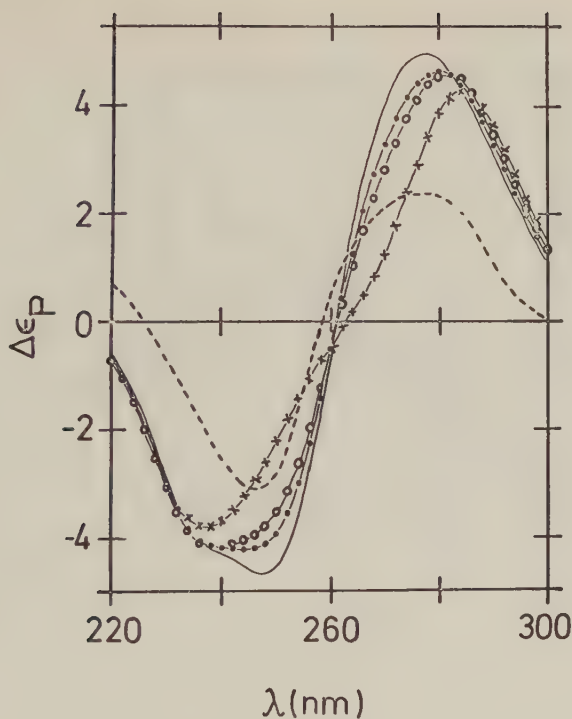


Abb. 59

Mit der TINOCO-Theorie ab initio berechnete CD-Spektren für freie DNA in der B-Konformation. (—) 33 % (G+C), (—●—●—) 43 % (G+C)., (—○—○—) 50 % (G+C)., (—x—x—) 72 % (G+C)., (----) gemessenes CD-Spektrum von Kalbsthymus-DNA., Die berechneten Intensitäten differieren von den gemessenen um nicht mehr als einen Faktor 2.

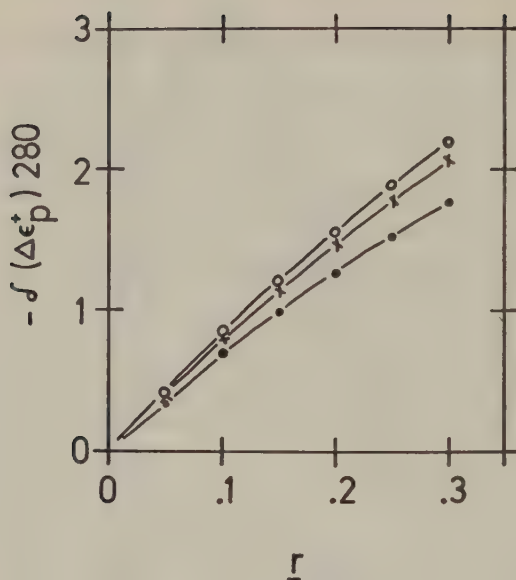


Abb. 60

Das den Meßdaten der Abb. 58 entsprechende Ergebnis der Berechnungen: die Intensitätsdifferenz im positiven Maximum der CD-Spektren von E Br-gebundener DNA und freier DNA: $-\Delta\epsilon_p^+$ bei 280 nm. Ordinatensymbol wie in Abb. 58; (-o-o-): 33 % GC., (-x-x-): 50 % GC., (-•-•-): 72 % GC.

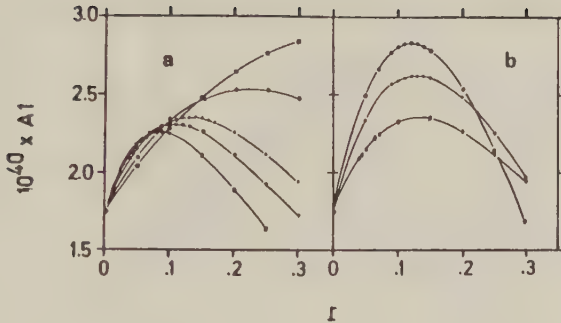


Abb. 61

Berechnete Werte des Koeffizienten A_1 mit der Theorie von JOHNSON und TINOCO (1969). Dieser Koeffizient mißt den Anteil der Stammfunktion des Absorptionsspektrums.

a) Variation von A_1 mit r für einen konstanten Aufschraubwinkel $\Delta\varphi = 12^\circ$ pro intercaliertes Molekül.

-□-□- $\Delta x = 1 \text{ \AA}$., -○-○- $\Delta x = 2 \text{ \AA}$., -·-·-·- $\Delta x = 3.36 \text{ \AA}$., -▽-▽-▽- $\Delta x = 4 \text{ \AA}$., -x-x- $\Delta x = 5 \text{ \AA}$.
 Δx ist die Vergrößerung des Abstandes der Ebenen zweier benachbarter Basenpaare in der Doppelhelix, zwischen die ein E Br intercaliert ("die Dicke" des Intercalanten).

b) Variation von A_1 mit r für verschiedene Aufschraubwinkel $\Delta\varphi$ bei konstant angenommener Abstandsvergrößerung ("Dicke des Intercalanten") von $\Delta x = 3.36 \text{ \AA}$.

-○-○- $\Delta\varphi = 36^\circ$., -·-·-·- $\Delta\varphi = 24^\circ$., -x-x- $\Delta\varphi = 12^\circ$.

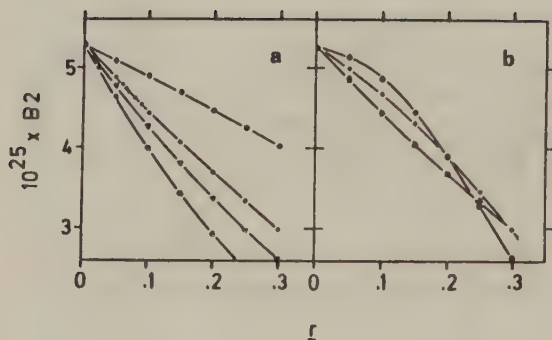


Abb. 62

Variation des Koeffizienten $B2$ mit r , berechnet nach der Theorie von JOHNSON und TINOCO (1969) für verschiedene angenommene Geometrieänderungen der DNA durch die Intercalation. Symbole wie in Abb. 61 a, b., Der Koeffizient $B2$ mißt den Beitrag der ersten Ableitung des Absorptionsspektrums zum CD-Spektrum.

Der dominante Anteil zum CD-Spektrum rührt von der ersten Ableitung her, und da $B2$ mit r für alle Geometrien abfällt (Abb. 62 a, b), wird das Ergebnis von Abb. 60 verständlich.



Abb. 63

Berechnete A1-Terme der CD-Spektren von DNA in der Geometrie von DNA-E Br-Komplexen. Der Term ist das Produkt aus dem Koeffizienten A₁, der Stammfunktion des effektiven Nukleotid-

Absorptionsspektrums, und aller zugehörigen Vorfaktoren (siehe Anhang), genommen an der Stelle 246 nm. Er hat daher die Dimension und Größenordnung der berechneten $\Delta \epsilon$ -Werte. Diese Abbildung zusammen mit Abb. 64 soll zeigen, welcher Anteil der berechneten Spektren (Abb. 65) von der Stammfunktion und welcher von der ersten Ableitung beigetragen wird.

- c) $\Delta \varphi = \text{const} = 12^\circ$., $\Delta x = \text{variabel.}$,
 (-□-□-): $\Delta x = 1 \text{ \AA}$., (-○-○-): $\Delta x = 2 \text{ \AA}$.,
 (-●-●-): $\Delta x = 3.36 \text{ \AA}$., (-▽-▽-): $\Delta x = 4 \text{ \AA}$.,
 (-✕-✕-): $\Delta x = 5 \text{ \AA}$., $\Delta x = \text{Dicke des Intercalanten.}$
- d) $\Delta x = \text{const} = 3.36 \text{ \AA}$., $\Delta \varphi = \text{variabel.}$,
 (-○-○-): $\Delta \varphi = 36^\circ$., (-●-●-): $\Delta \varphi = 24^\circ$.,
 (-✕-✕-): $\Delta \varphi = 12^\circ$., $\Delta \varphi = \text{Aufschraubwinkel pro Intercalant.}$
- e) In der Tat zeigen die beiden Anteile der Linearkombination des CD-Spektrums ($A_1 \times \text{Stammfunktion}$, $B_2 \times \text{erste Ableitung}$) denselben Gang mit r bei variabler Interkalationsgeometrie wie die Koeffizienten A_1 und B_2 allein. (Abb. 63 c, d; Abb. 64, e, f). Dies war nicht anders zu erwarten.
- f) Die vorherberechneten CD-Spektren für DNA mit unterschiedlichem (G+C)-Gehalt im Vergleich zu einem gemessenen DNA-CD-Spektrum sind in Abb. 59 angegeben. Die Variation der Gestalt der vorhergesagten Spektren mit dem GC-Gehalt ist nicht so stark, wie die Variation der gemessenen CD-Spektren von DNA aus verschiedenen Spezies mit unterschiedlichem (G+C)-Gehalt (Abb. 11 - 16).
- g) Abb. 65 veranschaulicht schließlich, wie sich das vorherberechnete Grundspektrum freier DNA bei Variation der Geometrie in der in Abb. 61 - 64 angenommenen Weise nach der TINOCO-Theorie verändern sollte. Die Variationen sind nicht sehr groß.

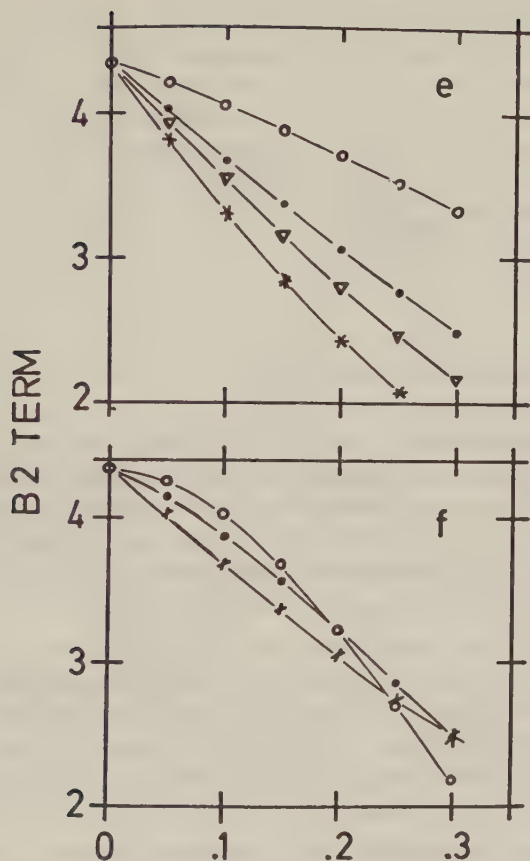


Abb. 64

Berechnete B2-Terme für CD-Spektren von DNA in der Geometrie von DNA-EBr-Komplexen. Der Term ist das Produkt aus dem Koeffizienten B2 und der ersten Ableitung des effektiven Nukleotid-Absorptionsspektrums sowie allen zugehörigen Vorfaktoren

(siehe Anhang) genommen an der Stelle 246 nm.

- e) $\Delta\varphi = 12^\circ = \text{const.}, \Delta x = \text{variabel.},$
 $(-\circ-\circ-): \Delta x = 2 \text{ \AA.}, (-\bullet-\bullet-): \Delta x = 3.36 \text{ \AA.},$
 $(-\nabla-\nabla-): \Delta x = 4 \text{ \AA.}, (-\times-\times-): \Delta x = 5 \text{ \AA.},$
f) $\Delta x = 3.36 \text{ \AA} = \text{const.}, \Delta\varphi = \text{variabel.},$
 $(-\circ-\circ-): \Delta\varphi = 36^\circ., (-\bullet-\bullet-): \Delta\varphi = 24^\circ.,$
 $(-\times-\times-): \Delta\varphi = 12^\circ.$

3.3.2.4 Diskussion der Berechnungen

Die vorhergesagte Variation des CD-Spektrums von DNA allein in variierend angenommenen Geometrien zeigt keine gute Korrelation zu den CD-Spektren des E Br-DNA-Komplexes, in denen die DNA voraussichtlich Geometrien annimmt, die den zur Berechnung angenommenen sehr ähnlich sind. Dazu können wir zwei Gründe als mögliche Ursachen nennen:

- Die Elektronenübergänge des E Br im fernen UV dürfen im CD-Spektrum des Komplexes nicht vernachlässigt werden, wie dies bei unseren Berechnungen geschah.
- Die TINOCO-Theorie ist grob - sie sagt nur das CD-Spektrum in der Grundgeometrie annähernd richtig voraus, nicht in variierten Geometrien.

Wahrscheinlich treffen beide Ursachen zusammen. Für Punkt a) spricht der Bereich der hohen Farbstoffkonzentrationen und r-Werte, in dem gearbeitet wurde. Für Punkt b) spricht die Tatsache, daß die Theorie von JOHNSON und TINOCO die CD-Spektren von DNA in der B-Konformation zwar annähernd richtig vorhersagt, aber bereits die Spektren von DNA in der C-Konformation nicht mehr richtig vorhersagt.

Leider hatten wir keine Möglichkeit, selber die Theorie dahingehend zu verbessern, daß die Elektroneneigenschaften

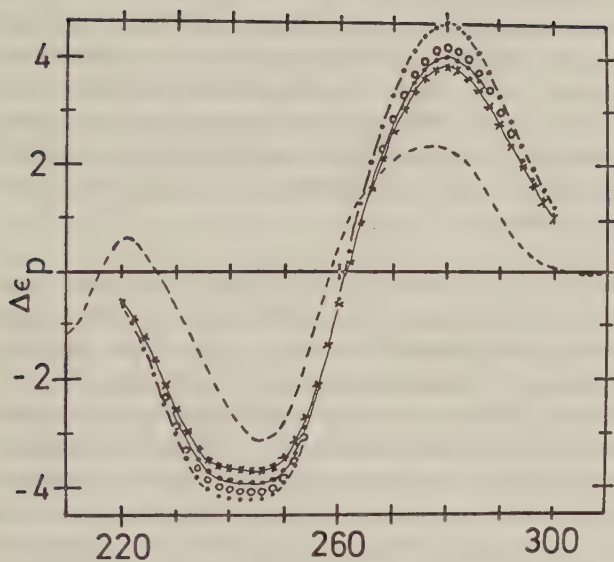


Abb. 65

Vorherberechnete CD-Spektren für DNA mit 43 % (G+C) bei $r = 0.10$. Konstante Dicke des Interkalantend $\Delta x = 3.36 \text{ \AA}$ und variable Aufschraubwinkel wurden angenommen. ($\Delta\varphi$).

—•—•—•—: DNA allein; x—x—x : $\Delta\varphi = 12^\circ$; —●—●—●— : $\Delta\varphi = 24^\circ$; —○—○—○— : $\Delta\varphi = 36^\circ$; — — — — : gemessenes CD Spektrum von Kalbs-Thymus-DNA in $10^{-3} \text{ M Tris pH 7.4}$.

des Farbstoffs mit einbezogen werden könnten. Dies ist ein quantentheoretisch schwieriges Problem, das zu lösen spezialisierten Quantentheoretikern überlassen bleiben muß.

Den Wert dieser Berechnungen, die nach der Meinung des Autors die wichtigsten Resultate dieser Arbeit sind, sehen wir darin, daß gezeigt werden konnte, daß die Quantentheorie in diesem Fall Spektren bis auf besser als einen Faktor 2 vorherzusagen in der Lage ist. Das Resultat gibt zu der Hoffnung Anlaß, daß bei weiterer Verbesserung der Theorie unter Einschluß der Elektronenübergänge des Farbstoffs Meßresultate unserer Art in Zukunft doch quantitativ interpretiert werden können.

Dies würde ein sehr wesentlicher Fortschritt sein, da derzeit keine guten Methoden zur Messung von DNA-Konformationsänderungen in Lösung zur Verfügung stehen. Nach Meinung des Autors liegt hier eine der wichtigsten Aufgaben für die Physik in der Biochemie: eine der Röntgenstrukturanalyse an Kristallen ähnlich aussagekräftige Methode zu Konformationsanalysen an biologisch interessanten Molekülen im wässrigen Milieu zu entwickeln. Dazu sind neben der Kern- und Elektronenspinresonanzspektroskopie die Methoden der optischen Spektroskopie (und hier wiederum der Zirkulardichroismus) die aussichtsreichsten Kandidaten. Deren Resultate werden quantitativ nur mit theoretischen Bemühungen der hier versuchten Art zu interpretieren sein.

3.3.2.5 Modifiziertes Intercalationsmodell für Proflavin

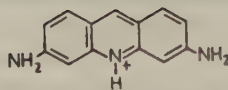
Die Hoffnung, im Fall des E Br-DNA Komplexes einen Modellfall vorliegen zu haben, anhand dessen sich die Konformationsänderung der DNA bei Intercalation zirkulardichrographisch besonders gut verfolgen ließe, mußte aus den dargelegten Grün-

den aufgegeben werden. Das erwünschte CD-Kriterium für Intercalation konnte daher aus dem E Br-Modellfall nicht abgeleitet werden.

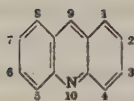
Dennoch konnten unsere CD-Befunde mit E Br bereits dazu herangezogen werden, das Intercalationsmodell für Proflavin und 3-Aminoacridine kritisch zu überprüfen und als Resultat ein anderes Intercalationsmodell für diese Farbstoffe vorzuschlagen als das klassische Modell von LERMAN (1961) für Proflavin (DALGLEISH, et al., 1971).

Die Strukturformeln der Aminoacridine sind in Abb. 66 angeführt. DALGLEISH, Fujita und Peacocke (1969) hatten gefunden, daß die Aminoacridine anhand des induzierten Zirkulardichroismus bei Assoziation an DNA in zwei Klassen eingeteilt werden können. Zu der Klasse I gehören 3-Aminoacridine und Proflavin. Zu der Klasse II gehören 1-, 2- und 9-Aminoacridine. Die Mitglieder der Klasse I zeigen starke, kooperative Zunahme der Intensität des induzierten Zirkulardichroismus im Sichtbaren Spektralbereich mit steigenden r -Werten. Die Mitglieder der Klasse II zeigten nur sehr geringe Veränderung in der Intensität des induzierten Zirkulardichroismus im Sichtbaren Spektralbereich in Abhängigkeit von r .

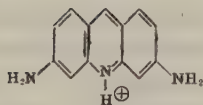
FULLER und WARING (1964) haben auf Grund von Röntgenstrukturanalysen ein Modell des Intercalationskomplexes für E Br und DNA vorgeschlagen, das in Abb. 67 gezeigt ist. Nach diesem Modell bindet der intercalierende Farbstoff außer durch die hydrophoren Wechselwirkungen der Ringsysteme hauptsächlich durch Wasserstoff-Brücken zwischen den beiden Aminogruppen des E Br und den Phosphatresten des DNA-Rückgrats. Die sperrigen Seitenketten (Äthylrest und Phenylrest) ragen in die große Grube der DNA. Wegen dieser sperrigen Seitenketten stehen dem E Br nicht viele andere Möglichkeiten zur Intercalation offen. Da auch kein anderer durch Strukturdaten gleich gut belegter Vorschlag für die Position des E Br-DNA-Komplexes bekannt ist, akzeptieren wir das Modell nach FULLER und WARING.



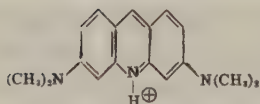
Proflavine



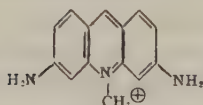
Acridine



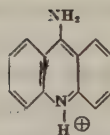
Proflavine cation



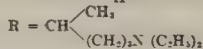
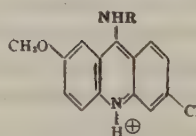
Acridine orange cation



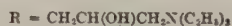
Acriflavine cation



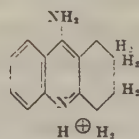
9-Aminoacridine cation



Atebrin (Mepacrine, Quinacrine) cation



Acranil cation



9-Amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine cation (THA).

Abb. 66

Strukturformeln der Aminoacridine

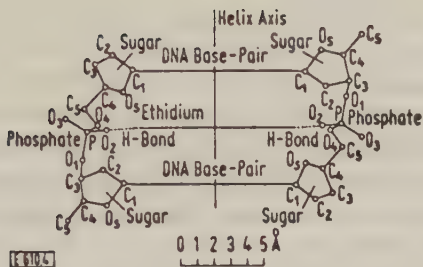


Fig. 4

Projection of the model for the intercalation of a molecule of ethidium between successive deoxyribonucleic acid base-pairs

Abb. 67

Das Modell für den E Br-DNA-Intercalationskomplex nach FULLER und WARING (1964)

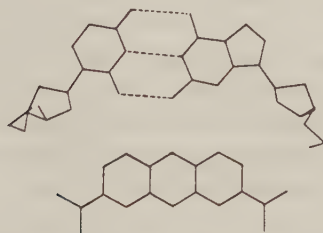


FIG. 4. A nucleotide pair at the site of intercalation, according to the model described in the text, projected on the plane perpendicular to the helix axis. A molecule of acridine orange is shown below to the same scale; hydrogen atoms are not indicated. The drawing shows the 5' O—P—O attached to one base (the purine) and the 3' O—P—O of the other as the extended sections of the backbone passing the intercalated acridine. The — 9° rotation of the next nucleotide pair would place it turned slightly clockwise above the pair shown, such that the ring oxygen of the left upper sugar is almost above the 1' carbon of the lower. The most central obstructions to the placement of the intercalated molecule are the ring oxygens of the sugars of the right-hand nucleotide in the pair below and the left-hand nucleotide of the pair above.

Abb. 68

Das Modell für den Proflavin-DNA-Komplex nach LERMAN (1961)

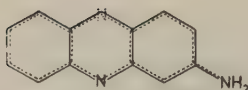


Abb. 69

Überlagerung von 2-Aminoacridin (gestrichelt) und 3-Aminoacridin (durchgehender Strich). Mit der hier gezeigten Spiegelung des heterozyklischen Stickstoffs an der Längsachse des Ringsystems können beide Substanzen die gleiche Wasserstoffbrücke zur DNA ausbilden (gestrichelte Linie).

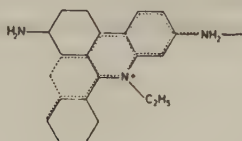


Abb. 70

Unser Modell für die Geometrie des Proflavin-Intercalationskomplexes im Vergleich zur Lage des E Br über den Basenpaaren. (genauere Beschreibung im Text.)

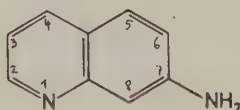


Abb. 71

Der gemeinsame Teil des Proflavin- und des Ethidium-Bromid-Gerüsts ist nach unserem Vorschlag für die Intercalationsgeometrie (Abb. 70) ein 7-Amino-Chinolin

LERMAN (1961) schlug für den Proflavin-DNA-Komplex ein Modell vor, welches Analogien zu dem FULLER-WARING-Modell für den E Br-DNA-Komplex aufweist. Es ist in Abb. 68 dargestellt. Nach diesem Modell werden durch die beiden Aminogruppen des Proflavins dieselben H-Brücken zu den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats gebildet wie im Falle des E Br, jedoch die Lage des heterozyklischen Stickstoffs ist anders. Er liegt in diesem Falle quasi an der Längsachse des Ringsystems gespiegelt und weist zur Helixachse hin, während er im E Br-Komplex zur großen Grube hinwies. Nach LERMAN's Vorschlag dürfte die genaue Lage des Ringstickstoffs nicht kritisch sein für die Ausbildung des Komplexes. Entscheidender wäre eine nahezu gleich große Überlappung der Ringsysteme des Farbstoffs und der Basenpaare sowie die Wasserstoffbrücken der Farbstoffaminogruppen zu den DNA-Phosphatresten.

Wir schlagen ein Gegenmodell zu LERMAN für den Proflavin-DNA-Komplex vor, das wir hauptsächlich aufgrund folgender beiden Befunde aufgestellt haben:

- 1.) Die 2- und 3- Aminoacridine fallen nach dem Verhalten ihres induzierten Zirkulardichroismus bei Komplexbildung mit DNA wie oben beschrieben in zwei verschiedene Klassen. Diese beiden Substanzen erlauben aber exakt dieselbe Überlappung der Ringsysteme und exakt dieselben Wasserstoff-Brückenbildungen von Aminogruppen zu DNA-Phosphat, wenn man Spiegelung des heterozyklischen Stickstoffs an der Längsachse des Ringsystems zulässt. Dies ist in Abb. 69 veranschaulicht. Wenn nach LERMAN's Modell die Lage des Ringstickstoffes nicht kritisch ist, sollten diese beiden Substanzen die gleichen Intercalationskomplexe bilden und in ihrem induzierten Zirkulardichroismus bei Komplexbildung in die gleiche Klasse fallen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Die Lage des Ringstickstoffes ist nach unserer Interpretation dieser Befunde keineswegs wie bei LERMAN unwichtig für die genaue Gestalt des Intercalationskomplexes,

sondern bestimmt diese mit. Für nicht substituierte Acridine ist nach Befunden von LÖBER (1969) der Ringstickstoff Ausgangspunkt der Bindungen an DNA.

- 2.) E Br zeigt dieselbe kooperative Abhängigkeit der Intensität des induzierten Zirkulardichroismus von r wie die Mitglieder der Klasse I der Aminoacridine (siehe Abb. 54) Daher suchten wir nach einer möglichen strukturellen Gemeinsamkeit der Intercalationskomplexe von E Br und den Mitgliedern der Klasse I (wie z. B. Proflavin), welche möglichst den in Punkt 1.) angeführten Überlegungen Rechnung tragen sollte. Unser Gegenmodell, das in Abb. 70 vorgestellt wird, erfüllt diese Anforderungen.

Nach unserem Modell geht für Proflavin nur eine der beiden Aminogruppen eine H-Brückenbindung mit einer DNA-Phosphatgruppe ein, die andere Aminogruppe ragt in die große Grube hinaus. Der heterozyklische Ringstickstoff liegt an gleicher Stelle wie im E Br-DNA-Komplex nach FULLER und WARING. Zwei der drei Ringe des Proflavins liegen in exakt gleicher Lage wie beim E Br-DNA-Komplex. Der gemeinsame Anteil der Strukturen dieser beiden Farbstoffe entspricht einem 7-Aminochinolin. (Siehe Abb. 71).

Für dieses Modell sprechen einige Beobachtungen:

- a) Nach diesem Modell wäre die Anlagerung von Proflavin-Dimeren an DNA, wie sie von ARMSTRONG (1970) gefunden worden ist, leichter zu erklären als nach dem LERMAN-Modell. Das zweite Farbstoffmolekül könnte an die in die große Grube herausragende Aminogruppe des ersten intercalierten Moleküls anlagern.
- b) Die von uns vorgeschlagene Bindungsposition würde ebenfalls leichter als die von LERMAN vorgeschlagene die Anlagerung von am Ringstickstoff N-substituierten Proflavin Molekülen an DNA gestatten. LÖBER (1969) beobachtete, daß solche Derivate mit fast gleicher Bindungskonstante an DNA binden

wie die nicht substituierte Stammverbindung.

Unser Modell ist mit Röntgenstruktur-Daten genauso verträglich wie LERMAN's Modell.

Leider war es uns bisher nicht möglich, mit einem N(1)-Alkyl-7-Aminochinolin unser Modell direkt zu testen. In den Chemical Abstracts der letzten 10 Jahre war kein Hinweis auf die Existenz solcher Verbindungen zu finden. Nachfrage bei Herrn Prof. DANN und Mitarbeitern vom Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, welche Chinolinderivate synthetisieren, ergab, daß es sehr schwer sein dürfte, solche Verbindungen zu synthetisieren. Sowohl vor als auch nach Ringschluß sind andere Positionen für Substitution mit einer Aminogruppe wesentlich reaktiver als C7, werden präferentiell substituiert und fangen den Substituenten vor dem C7.^{ab)} Auch das 7-Chloro -4-Amino - Chinolin (Chloroquin) (Abb. 72) kann hier nicht zum Beleg für unsere Vorstellungen herangezogen werden. Wohl ist bekannt, daß diese Substanz

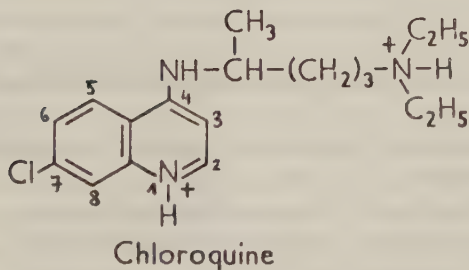


Abb. 72

Chloroquin = 7-Chloro-4-Amino-Chinolin

in DNA intercaliert, (O'BRIEN und HAHN, 1965), aber in diesem Fall ist der Intercalationskomplex ein anderer als nach unserem Modell. Das liegt daran, daß der 7-Substituent hier nicht eine elektro-positive Aminogruppe ist sondern eine elektronegative Chlorgruppe. Diese Gruppe bindet nicht zum ebenfalls elektronegativen DNA-Phosphat hin, sondern weist von diesem weg zur elektroneutraleren Helixachsen- Region. Dafür zeigt bei dieser Substanz der 4-Aminosubstituent (1-Diäthylamino-4-Aminopentan) Affinität zum DNA-Phosphat.

3.3.2.6 Zusammenfassung der Resultate und Ethidium Bromid

Zwar konnte hier von unseren CD-Resultaten mit E Br nicht in dem Sinne Gebrauch gemacht werden, daß ein daraus hergeleitetes notwendiges und hinreichendes CD-Kriterium für Intercalation im Fall des Proflavins oder der anderen 3-Aminoacridine eine Entscheidung über intercalativen oder nicht intercalativen Bindungsmodus erlaubt hätte. Aber die Beobachtung des stark kooperativen Verhaltens des induzierten Zirkulardichroismus für diese Substanzgruppen und für das Ethidium im Gegensatz zum Verhalten der 1-, 2-, 9-Aminoacridine im Sichtbaren Spektralbereich ließ auf Gemeinsamkeiten der Komplexstruktur von E Br und den 3-Aminoacridinen schließen. Auf diesem Argument und den weiteren angeführten Überlegungen (unterschiedlicher induzierter CD für 2- und 3-Aminoacridine etc.) basierte unser Gegenvorschlag zum Lerman-Modell für die Intercalation von Proflavin und 3-Aminoacridinen. CD-Kriterien erbrachten hier also nicht so sehr eine Entscheidung über das "Ob-oder-Nicht" der Intercalation, sondern vielmehr über das "Wie ?".

Da bisher viele intercalierende Substanzen bekannt sind, die unterschiedliche Intercalationskomplexe zeigen (Chloroquin, 3-Aminoacridine, 9-Aminoacridine, verschiedene Acridinderivate nach LÖBER (1969) und DALGLEISH et al.(1971)u. a.),

wird es voraussichtlich auch gar nicht möglich sein ein allgemein anwendbares und dennoch scharfes CD-Kriterium für Intercalation herzuleiten, welches es gestattet für diverse neu zu untersuchende Substanzen den Schluß auf Intercalation zu ziehen. Der Zirkulardichroismus ist eine auf Konformationsänderungen derart sensible Methode, daß er nach unserem derzeitigen Verständnis eher die Unterschiede aller dieser verschiedenen Intercalationskomplexe anzeigen würde, als den daraus abstrahierten gemeinsamen Oberbegriff der Intercalation. Das einzige CD-Kriterium, welches derzeit allgemein auf Intercalation Hinweise zu ziehen gestattet und welches wir abschließend aus dem Vergleich unserer Ergebnisse mit Chromomycin, Mithramycin, Daunomycin, Nogalamycin und Ethidium-Bromid angeben können, ist ein kooperatives Verhalten der induzierten CD-Intensität. Wenn dieses Verhalten beobachtet wird, ist Intercalation wahrscheinlich. Wenn es nicht beobachtet wird, kann dennoch Intercalation vorliegen. (Für 9-Aminoacridine wird es im Sichtbaren nicht beobachtet, im UV dagegen sehr wohl). Für nicht intercalative Bindungstypen wurde es dagegen bisher nicht beobachtet.

3.3 Zusammenfassung der wichtigsten Resultate der Arbeit

- a) Für die Chromoglykosid-Antibiotika Chromomycin und Mithramycin konnte durch die Methode der Zirkulardichrographie Komplexbindung an DNA in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen nachgewiesen werden. Es konnte eine Praeferenz für (G+C)-Paare gefunden werden und eine Austauschbarkeit von Mg^{2+} gegen Co^{2+} - Ionen. Mit Cu^{2+} -Ionen dagegen wurde keine Komplexbildung beobachtet.
- b) Für die Anthrazyklin-Antibiotika Daunomycin und Nogalamycin konnte ebenfalls Komplexbindung an DNA nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit von Metallionen wurde dabei nicht gefunden. Die Kinetik der Komplexbildung ist

kompliziert. Eine AT-Präferenz wurde nicht gefunden, allenfalls eine leichte GC-Präferenz.

- c) Chromomycin und Mithramycin binden in einer sehr ähnlichen Konfiguration an DNA, erzeugen aber keine nachweisbaren kooperativen Änderungen der Amplituden des CD-Spektrums, so daß der Bindungsmodus wahrscheinlich nicht intercalativ ist.
- d) Nogalamycin und eindeutiger Daunomycin erzeugen kooperative Variation der CD-Amplituden; ein interkalativer Bindungsmodus ist mit unseren CD-Daten verträglich. Nach unseren Befunden können Daunomycin und Nogalamycin in stärker voneinander abweichenden Modus binden als Chromomycin und Mithramycin.
- e) Für die Bindung von Ethidium Bromid an DNA verschiedenen (GC)-Gehaltes konnte keine Basenpräferenz gefunden werden. Aus dem Vergleich der CD-Spektren von Ethidium-DNA-Komplexen und den Spektren von Aminoacridin-DNA-Komplexen konnte ein neues Intercalationsmodell für Proflavin formuliert werden.
- f) CD-Spektren von DNA verschiedener Spezies wurden katalogisiert und heuristisch beschrieben.
- g) Das CD-Spektrum von freier DNA konnte mit Hilfe der Theorie von JOHNSON und TINOCO bis auf besser als einen Faktor 2 ab initio berechnet werden. Die Variationen dieses Spektrums mit der Geometrie der DNA wurden berechnet.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Alberts, B.M., Doty, P. (1968)
J. Mol. Biol. 32, 379

Armstrong, R.W., Kurecsev, T., Strauss, U.P. (1970)
J.Amer.Chem.Soc. 92, 3174

Behr, W., Honikel, K., Hartmann, G., (1969)
Eur. J. Biochem. 9, 82

Behr, W., Hartmann, G., (1965)
Biochem. Z. 343, 519

Brahms, J. (1970)
persönliche Mitteilung

Berthold, H., Giessner - Prettre, C., Pullman, A. (1967)
Int. J. Quantum Chem. 1, 123

Bhuyan, B.K., Smith, C.G., (1965)
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 54, 566

Bernard, J., Paul, R., Boiron, M., Jacquillat, C., Maral, R.,
Rubidomycin In d. Serie "Recent Results in Cancer Research",
Vol 20, (Paris, 1968), Springer Verlag, Berlin

Bielicki, Henri (1913)
Phys. Zeit. 14, 516

Cheng, P.Y., (1965)
Biochim Biophys.Acta 102, 314

Courtois, Y., Fromageot, P., Guschlbauer, W., (1968)
Eur.J.Biochem. 6, 493

Calendi, E., DiMarco, A., Reggiani, M., Scarpinato, B.,
Valentini, L., (1965)
Biochim.Biophys.Acta 25, 103

Dalgleish, D.G., Peacocke, A.R., Fey, G., Harvey, G., (1971)
Biopolymers, 10, 1853

Dalgleish, D.G., Peacocke, A.R., Acheson, R.M., Harvey, C.W.,
in press

Dalgleish, D.G., Fujita, H., Peacocke, A.R., (1969)
Biopolymers 8, 633

Dalgleish, D.G., Dingsoyr, E.,
in Vorbereitung
Drummond, D.S., Pritchard, N.J., Simpson-Gildemeister, V.W.F.,
Peacocke, A.R., (1966)
Biopolymers 4, 971

Eichhorn, Clark, (1963)
J. Am. Chem. Soc. 85, 4020

Erfmann, H., (1969)
Dissertation, Münster

Fuller, W., in "Genetic Elements, Properties and Function"
3 rd FEBS-Meeting, Warschau (1966)
ed. Shugar, p. 17

Fuller, W., Waring, M.J. (1964)
Ber. der Bunsenges. physik. Chem. 68, 805

Goldberg, I.H., Friedmann, P.A., (1971)
Ann. Rev. Biochem. 40, 755

Gratzer, W.B., Hill, L.R., Owen, R.J., (1970)
Eur. J. Biochem. 15, 209

Hartmann, G., Goller, H., Koschel, K., Kersten, W., Kersten, H.
(1964)
Biochem. Z. 341, 126

Hayasaka, K.L., Inoue, M.N., (1969)
Biochemistry 8, 2342

Johnson, W.C., Tinoco, I., (1969)
Biopolymers 7, 727

Kersten, W., Kersten, H., Steiner, F.E., Emmerich, B., (1967)
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 348, 1415

Kersten, W., Kersten, H. (1967)
in Intern. Symp. "Wirkungsmechanismen von Fungiziden und
Antibiotika", Akademie Verlag, Berlin, 1967, p. 177

Kersten, W., Kersten, H., (1968)
in "Molecular Associations in Biology",
Academic Press, New York, 1968 , p. 289

Kersten, W., Kersten, H., Szybalski, W., (1966)
Biochemistry 5, 236

Ketelaar, J.A.A. (1958)
in "Chemical Constitution, An Introduction to the Theo-
ry of Chemical Bond", Van Nostrand, Princeton p. 91

Koschel, K., Hartmann, G., Kersten, W., Kersten, H., (1966)
Biochem. Z. 344 , 76

Lerman, L.S., (1961)
J.Mol.Biol. 2, 18

Langridge, R., Marvin, D.A., Seeds, W.E., Wilson, H.R.,
J.Mol. Biol. 2, 38 (1960)

Paoletti, J., LePecq, J.-B. (1971)
J. Mol. Biol. 59, 43

Lowry, T.M., (1935)
Optical Rotatory Power, Neuauflage Dover, New York, 1964

Löber, G., Achterte, G., (1969)
Biopolymers 8, 595

Moscowitz, A., (1967)
Proc.Roy.Soc. London, 297 A, 16

Marmur, J., (1961)
J.Mol.Biol., 3, 208

Müller, W., (1971)
persönliche Mitteilung

Miyamoto, M., Kawamatsu, Y., Kawashima, K., Shinohara, M.,
Tanaka, K., Tatsuoka, K., Tatsuoka, S., Nakanashi, K.,
Tetrahedron Letters, 23, 421, (1967)

McMullen, D.W., Jaskunas, S.R., Tinoco, I., (1967)
Biopolymers 5, 585

Nakada, D., (1965)
Biochim.Biophys.Acta 103, 455

O'Brien, R.L., Hahn, F.E., (1965)
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 135

Peacocke, A.R., Skerrett, J.N.H., (1956)
Trans. Faraday. Soc. 52, 26

Pigram, W.J., Fuller, W., Hamilton, L.D., (1972)
Nature New Biol. 235, 17

Pabst Laboratories, (1956)
Circular OR-10, Milwaukee, Wisconsin

Rassat, A., (1967)
in Snatzke, ed. "Optical Rotatory Dispersion and Circular
Dichroism in Organic Chemistry", London p. 314

Richardson, A., (1966)
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 55, 1616

Rosen, A. (1970)
Biochem. Pharmacol., 19, 2075

Szybalski, W., Opara-Kubiśka, (1965)

Saito, H., Miura, K.I., (1963)
Biochim.Biophys.Acta 72, 619

Snatzke, G., (1969)
persönliche Mitteilung

Tinoco, I., (1968)
J.Chim.Phys. 65, 91

Voet, D., Gratzer, W.B., Cox, R.A., Doty, P., (1963)
Biopolymers 1, 193

Velluz, L., Legrand, M., Grosjean, M. (1965)
"optical circular dichroism" Verl. Chemie, Weinheim

Waring, M.J., (1965)
J.Mol.Biol. 13, 269

Waring, M.J. (1969)
persönliche Mitteilung

Waring, M.J., (1970)
J.Mol.Biol. 54, 247

Ward, D., Reich, E., Goldberg, I.H., (1965)
Science, 149, 1259

Wanke, H., (1971)
Dissertation, Münster

Wilkins, M.H.F., Arnott, P.A., (1965)
J.Mol. Biol. 11, 391

Yamane, T., Davidson, N., (1961)
J.Am.Chem. Soc. 83, 2599

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die diese Arbeit unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. H. Kersten für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit; Herrn Prof. Dr. W. Kersten für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und alle organisatorische Hilfe.

Herrn Dr. G. Snatzke, Herrn Dr. Kuball und Mitarbeitern, Herrn Prof. Dr. A. R. Peacocke und Herrn Dr. I.O. Walker für die Möglichkeit, an ihren Zirkulardichrographen die Messungen zu dieser Arbeit durchzuführen; Herrn Dr. Geibel für die Kernresonanzuntersuchungen und Herrn Dr. D. G. Dalgleish für die gute Zusammenarbeit während eines Teils des experimentellen Programms.

Den Mitarbeitern des Universitäts-Rechenzentrums der Universität Erlangen und den Mitarbeitern und Kollegen am Physiologisch Chemischen Institut.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Projekts im Rahmen des Forschungsvorhabens "Molekulare Biologie - Physikalisch Chemische Untersuchungen an biologischen Makromolekülen".

Lebenslauf

Georg Fey

geb. am : 1. Juni 1944

in : Rietberg (Kreis Wiedenbrück), Westfalen

Eltern : Vater: Dr. Wilhelm Fey, Arzt
Mutter: Helmutrud Fey, geb. Rieländer

Familienstand : seit 1970 verheiratet mit Marianne Fey,
geb. Reymond, 1 Kind, Natalie, geb. 1972

Schulen : 1. bis 3. Klasse Volksschule in Rietberg/
Westf.
4. Klasse Volksschule in Wuppertal-Elberfeld
1. bis 3. Klasse am altsprachlichen Wilhelm
Dörpfeld Gymnasium in Wuppertal-Elberfeld
4. bis 8. Klasse am altsprachlichen Aloisius-
Kolleg in Bad Godesberg als Internatsschüler
9. Klasse am altsprachlichen Mauritiusgymna-
sium in Buren/Westf. als Internatsschüler
Abitur 1963

Studium : 1963 bis 1966 in Bonn, Physik
1966 bis 1968 in Orsay, Naturwissenschaftliche
Fakultät der Universität Paris und in Saclay,
Kernforschungszentrum des frz. Atomenergie-
kommissariats., Physik, Stipendiat der frz.
Regierung. Als Student Mitglied der Studien-
stiftung des deutschen Volkes und des Cusanus-
werks.

Prüfungen : 4. 11. 1965 Diplom-Vorprüfung in Physik, Bonn
5. 7. 1967 Diplome de physique des accelera-
teurs de particules, INSTN, Saclay
13. 11. 1968 Doctorat 3^{ème} cycle, Univ. Paris

Stellungen : seit 1. 2. 1969 Verwalter der Dienstgeschäfte
eines wissenschaftlichen Assistenten am Phy-
siologisch-Chemischen Institut der Universität
Erlangen

Auslands-
tätigkeit : Sommer 1969: 1 Monat FEBS-Sommer-Schule über
Biophysik der Makromoleküle, Groningen, Nie-
derlande
Herbst 1969: 2 Monate Forschungsaufenthalt
(DFG) am Nuffield Institute of Clinical Bio-
chemistry, Radcliffe Infirmary, Universität
Oxford, England
Sommer 1972: 1 Monat Sommerschule in Cold
Spring Harbor, USA; Tumor Virus Workshop.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990